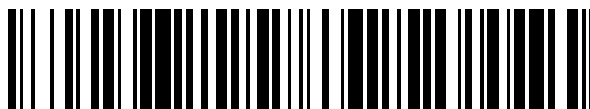


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 334**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/IB2012/002626**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13034989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12829323 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2753692**

54 Título: **Métodos y ensayos basados en microARN para el osteosarcoma**

30 Prioridad:

07.09.2011 US 201161531942 P
05.09.2012 US 201261696981 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
15.10.2019

73 Titular/es:

3-D MATRIX LTD. (50.0%)
3-2-4 Kojimachi, Chiyoda-ku
Tokyo 102-0083, JP y
NATIONAL CANCER CENTER (50.0%)

72 Inventor/es:

OCHIYA, TAKAHIRO y
FUJIWARA, TOMOHIRO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 727 334 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y ensayos basados en microARN para el osteosarcoma

5 Antecedentes de la invención

Existen cada vez más pruebas de que los tumores contienen un subconjunto de células con propiedades similares a las células madre. Estas células, con frecuencia denominadas "células madre cancerosas" (CSC) o "células iniciadoras de tumores" (TIC), son responsables de formar la mayor parte del tumor. Estas CSC poseen capacidades tanto de auto-renovación como de diferenciación y se cree que dan lugar a heterogeneidad del tumor. Asimismo, se ha mostrado que están asociadas con las características más letales de los tumores: la resistencia a fármacos y la metástasis. La primera prueba de la existencia de CSC provino de estudios de neoplasias malignas hematológicas en 1994. Más recientemente, se han identificado CSC en varios tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama, cerebro, piel, pulmón, colon, pancreático, hígado, cabeza y cuello, próstata, ovárico y gástrico.

El osteosarcoma es la neoplasia maligna ósea primaria más común y representa el 60 % de todos los tumores óseos malignos infantiles. Antes de la quimioterapia multiagente, la amputación proporcionó una tasa de supervivencia a largo plazo de solo -20 %. Desde la década de 1970, la quimioterapia de combinación junto con la cirugía con conservación de la extremidad ha sido el tratamiento principal para el osteosarcoma. Actualmente, se ha señalado que la supervivencia a los 5 años para los pacientes con osteosarcoma es del 50 % al 80 %. Sin embargo, esta tasa de supervivencia no ha mejorado en los últimos 10 años y el 40 % de los pacientes con osteosarcoma mueren a causa de su enfermedad.

Las moléculas de dirección importantes en la tumorigénesis, conocidas como "terapia dirigida", han sido un desarrollo emocionante en el tratamiento del cáncer en los últimos diez años. Sin embargo, actualmente no hay ninguna terapia dirigida disponible para el osteosarcoma. Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para el osteosarcoma.

CD133, también conocida como AC133 y Prominina 1 (PROM1), es una glucoproteína de cinco dominios transmembrana de función desconocida. Fue el primer miembro identificado de la familia prominina de glucoproteínas de cinco dominios transmembrana. En 1997, Yin *et al.* produjeron un nuevo anticuerpo monoclonal que reconocía el antígeno AC133, un epítipo dependiente de la glucosilación de CD133, y detectaron la expresión de AC133 en células progenitoras positivas para CD34 de sangre de adultos. El ADNc de CD133 codifica una molécula de 5 dominios transmembrana con un extremo N extracelular, un extremo C citoplásmico y dos bucles extracelulares grandes con ocho sitios de consenso para la glucosilación ligada a N. Un rasgo característico de CD133 es su rápida regulación negativa durante la diferenciación celular. Esta característica convierte a CD133 en un marcador de superficie celular único para la identificación y el aislamiento de células madre y células progenitoras en varios tejidos. Según la teoría de las CSC, las CSC expresan algunos de los marcadores de células madre de las células madre normales. Por lo tanto, se cree que las células tumorales que expresan CD133 independientemente o en combinación con otros marcadores de células madre o células progenitoras representan CSC. Hasta ahora, sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes en el fenotipo de CSC que expresan el marcador de superficie celular CD 133 han permanecido desconocidos.

Los microARN (miARN), descubiertos por primera vez en 1993 como un pequeño ARN no codificante de proteínas, son pequeñas moléculas de ARN reguladoras que modulan la expresión de sus genes diana y desempeñan funciones importantes en una diversidad de procesos fisiológicos y patológicos, tales como el desarrollo, la diferenciación, la proliferación celular, la apoptosis y las respuestas a la tensión. La biogénesis de miARN requiere varias etapas de procesamiento post-transcripcional para producir el miARN maduro funcional. Durante los últimos años, se han investigado muchos miARN en diversos cánceres humanos. Se ha mostrado que la desregulación de la expresión de los miARN contribuye al desarrollo del cáncer a través de diversos tipos de mecanismos, incluyendo supresiones, amplificaciones o mutaciones que implican loci de miARN, silenciamiento epigenético, la desregulación de los factores de transcripción que se dirigen a miARN específicos o la inhibición del procesamiento. El perfil de expresión de miARN es cada vez más importante como una herramienta de diagnóstico y pronóstico útil y muchos estudios han indicado que los miARN actúan como oncogenes o como supresores de tumores.

Los miARN humanos miR-1 y miR-133a están ubicados en la misma región cromosómica, en un denominado grupo. Enriquecidos en músculo, son miARN que inhiben la proliferación de células progenitoras y promueven la miogénesis al dirigirse a la histona desacetilasa 4 (HDAC4) y el factor de respuesta sérica (SRF), respectivamente. Se ha señalado que miR-1 está sobreexpresado en individuos con arteriopatía coronaria, mientras que se ha señalado que ambos de estos miARN se expresan en niveles bajos en la hipertrofia cardíaca. A pesar de varios estudios, su importancia en la fisiología muscular y la enfermedad aún no está clara. Recientemente, miR-133a (cuyo nombre no guarda relación con el nombre CD133) se ha considerado prescindible para el desarrollo normal y la función del músculo esquelético. Sin embargo, la relación entre estos miARN y CSC ha sido, hasta ahora, desconocida.

Gougelet *et al* (International Journal of Cancer 129 (680-690) 2011) identificaron cinco miARN (mir-92a, miR996, miR-

193a, miR132 y miR422a) en tumores de pacientes que podrían ser útiles en el diagnóstico del osteosarcoma.

Se ha descubierto que el miARN miR-10b humano está asociado positivamente con una neoplasia maligna de alto grado. Esta asociación se mantuvo para diversos tipos de cáncer. miR-10b es uno de los miARN más significativamente regulados positivamente en adenocarcinomas pancreáticos y glioblastomas humanos, dos tipos de cánceres muy metastásicos y/o invasivos. Este miARN se expresa en gran cantidad en células cancerosas metastásicas propagadas como líneas celulares, así como en tumores de mama metastásicos en pacientes, y también está regulado positivamente en los carcinomas hepatocelulares metastásicos en relación con los que no son metastásicos. La importancia de miR-10b en el desarrollo del sarcoma no se ha señalado previamente.

Sumario de la invención

Un aspecto de la invención es una cantidad eficaz de una molécula antisentido específica para un microARN (miARN) seleccionado de miR-1, miR-10b y miR-133a para su uso en el tratamiento del osteosarcoma en un sujeto que lo necesite.

En una realización, la molécula antisentido es ARN estabilizado.

En una realización, el ARN estabilizado es un oligonucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA).

En una realización, la molécula antisentido es ADN.

En una realización, la molécula antisentido tiene una longitud de 20-30 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos al menos 90 por ciento idéntica a 5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4), 5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5) o 5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6).

En una realización, la molécula antisentido tiene una longitud de 21-30 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos al menos 95 por ciento idéntica a 5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4), 5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5) o 5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6).

En una realización, la secuencia de la molécula antisentido es

5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4),
5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5) o
5'-CAGCTGGTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6).

En una realización, la molécula antisentido tiene una longitud de 20-30 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos al menos 90 por ciento idéntica a

5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7),
5'-CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8),
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9),
5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10),
5'-CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11) o
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12).

En una realización, la molécula antisentido tiene una longitud de 21-30 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos al menos 95 por ciento idéntica a

5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7),
5'-CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8),
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9),
5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10),
5'-CACAAAATTCGGTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11) o
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12).

En una realización, la secuencia de la molécula antisentido es

5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7),
5'-CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8),
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9),
5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10),
5'-CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11) o
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12).

En una realización, la molécula antisentido está asociada con un vehículo de suministro de ácido nucleico.

En una realización, el osteosarcoma es osteosarcoma metastásico.

Se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico aislada de 20-30 nucleótidos de longitud que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 90 por ciento idéntica a

5 5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4),
5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5) o
5'-CAGCTGGTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6)

10 Se describe en el presente documento la molécula de ácido nucleico aislada que tiene una longitud de 21-30 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos al menos 95 por ciento idéntica a

15 5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4),
5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5) o
5'-CAGCTGGTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6).

La secuencia de la molécula de ácido nucleico aislada puede ser

20 5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4),
5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5) o
5'-CAGCTGGTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6).

Se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico aislada de 20-30 nucleótidos de longitud que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 90 por ciento idéntica a

25 5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7),
5'-CACAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8),
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9),
5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10),
30 5'-CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11) o
5'-CAGCTGGTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12).

La molécula de ácido nucleico aislada puede tener una longitud de 21-30 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos al menos 95 por ciento idéntica a

35 5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7),
5'-CACAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8),
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9),
5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10),
40 5'-CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11) o
5'-CAGCTGGTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12).

La secuencia de la molécula de ácido nucleico aislada puede ser

45 5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7),
5'-CACAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8),
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9),
5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10),
5'-CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11) o
50 5'-CAGCTGGTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12).

La molécula de ácido nucleico puede estar asociada con un vehículo de suministro de ácido nucleico.

Un aspecto de la invención es un método para evaluar la resistencia del osteosarcoma a una terapia antineoplásica en una muestra de tejido que comprende células de osteosarcoma; que comprende
55 aislar de la muestra células que expresan CD133;
medir un primer nivel de expresión por las células que expresan CD133 de al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a;
poner en contacto las células que expresan CD133 con una terapia antineoplásica; y
60 medir un segundo nivel de expresión por las células que expresan CD133 de al menos un miARN, en donde un segundo nivel de expresión mayor que el primer nivel de expresión indica que el osteosarcoma es resistente a la terapia antineoplásica.

En una realización, la terapia antineoplásica se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, doxorubicina, metotrexato y cualquier combinación de los mismos.

Un aspecto de la invención es un método de detección del osteosarcoma. El método incluye la etapa de realizar en una muestra de tejido de un sujeto un ensayo específicamente capaz de detectar al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a, en donde la detección por el ensayo de la presencia en la muestra del al menos un miARN indica que el sujeto está en riesgo de tener osteosarcoma.

En una realización, el tejido es sangre.

En una realización, el tejido es suero.

Un aspecto de la invención es un método para controlar el osteosarcoma en una muestra de tejido obtenida de un sujeto que tiene osteosarcoma o que ha sido tratado de osteosarcoma; que comprende:

(a) realizar un ensayo específicamente capaz de cuantificar el nivel de expresión de al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a; y

(b) repetir la etapa (a) en una muestra de tejido obtenida posteriormente del sujeto, en donde un nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida posteriormente mayor que el nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida anteriormente indica que el osteosarcoma es progresivo y un nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida posteriormente menor que el nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida anteriormente indica que el osteosarcoma es regresivo.

En una realización, el tejido es sangre.

En una realización, el tejido es suero.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un grupo de siete análisis representativos de FACS de diversas líneas celulares de osteosarcoma humano indicadas basados en su expresión de CD133 (eje X) y CD44 (eje Y).

La Figura 2 es un *collage* que comprende un análisis de FACS que representa la selección de células SaOS2 CD133^{alto} y CD133^{bajo} (panel superior); cuatro microfotografías que representan la división celular asimétrica en la población CD133^{alto} el día 1 y el día 8 (panel central); y dos análisis de FACS por tinción de PKH para cada población el día 14 (panel inferior). Barras de escala, 50 μ m.

La Figura 3 es un grupo de cuatro microfotografías y un gráfico de barras que representa ensayos de formación de esferas en células HOS-GFP CD133^{alto} y CD133^{bajo} recién aisladas. Las fotografías se tomaron el día 5 y se contó el número de esferas en cada pocillo ($n = 3$ por grupo, $**P < 0,01$). Barra de escala, 200 μ m.

La Figura 4 es un gráfico de barras que representa la sensibilidad al fármaco de poblaciones de células SaOS2 CD133^{alto} y CD133^{bajo}. Se analizaron células viables relativas a doxorrubicina (DOX, 0,03 μ M), cisplatino (CDDP, 2,5 μ M) y metotrexato (MTX, 0,32 μ M) ($n = 3$ por grupo, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$).

La Figura 5 es un par de microfotografías y un gráfico de barras que representan ensayos de invasión en poblaciones de células SaOS2 CD133^{alto} y CD133^{bajo} ($n = 3$ por grupo, $**P < 0,01$). Barra de escala, 200 μ m.

La Figura 6 es un gráfico que representa el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) de transportadores multirresistentes a fármacos asociados a células madre y genes asociados a metástasis de poblaciones de células SaOS2 CD133^{alto} y CD133^{bajo}. Se utilizó β -actina como control interno.

La Figura 7 es un grupo de ocho imágenes fotográficas que representan la tumorigenicidad de poblaciones de células HOS-*luc* CD133^{alto} y CD133^{bajo} en ratones. La luminiscencia de los tumores con xenoinjertos de células HOS-*luc* CD133^{alto} (muslos derechos de los animales) y CD133^{bajo} (muslos izquierdos de los animales) se identificó mediante un sistema de captura de imágenes *in vivo* (IVIS). La población de CD133^{alto} formó tumores desde solo 100 células ($n = 5$ por grupo).

La Figura 8 es un par de análisis de FACS que representan poblaciones de células CD133^{alto} en muestras clínicas de osteosarcoma.

La Figura 9 es un gráfico que representa la supervivencia sin metástasis en pacientes con osteosarcoma basándose en la expresión de CD133. Los pacientes con alta expresión de CD133 tuvieron una mediana de supervivencia sin metástasis de menos de 60 meses ($n = 35$, prueba de rangos logarítmicos, $P = 0,0262$).

La Figura 10 es un diagrama de Venn que representa miARN regulados positivamente y regulados negativamente en células CD133^{alto} y CD133^{bajo} de SaOS2 y HOS.

La Figura 11 es un gráfico de barras que representa miR-1, miR-10b y miR-133a regulados positivamente en poblaciones CD133^{alto} de células SaO2 y HOS en comparación con una población CD133^{bajo} (**P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001).

La Figura 12 es un gráfico que representa la expresión de miR-1, miR-10b y miR-133a en células SAOS2 CD133^{bajo} transfectadas con oligonucleótidos de miARN en comparación con células SAOS2 CD133^{bajo} transfectadas con oligonucleótidos de miR-CN (control negativo) (escala logarítmica, *n* = 3 por grupo, **P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001).

La Figura 13 es un gráfico que representa ensayos de invasión en células CD133^{bajo} purificadas transfectadas con oligonucleótidos de miR-1, miR-10b y miR-133a o CN (**P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001).

La Figura 14 es un gráfico que representa la resistencia al fármaco en células CD133^{bajo} transfectadas con oligonucleótidos de miR-1, miR-10b, miR-133a o miR-CN (MTX, metotrexato a 0,22 mM; **P* < 0,05, ***P* < 0,01).

La Figura 15 es una representación esquemática de vectores plasmídicos utilizados para la sobreexpresión estable de miR-133a en células CD133^{bajo}. NruI, NotI, XbaI: sitios de endonucleasas de restricción; P_{CMV}, promotor de citomegalovirus; MCS, sitio de clonación múltiple; IVS, secuencia intermedia; IRES, sitio interno de entrada al ribosoma; Hyg^r, gen de resistencia a higromicina; SV40 poli A, cola de poliA de SV40.

La Figura 16 comprende cuatro pares de imágenes fotográficas que representan la tumorigenicidad de células HOS-*luc* CD133^{bajo} que expresan de forma estable miR-133a (patas derechas) en comparación con células HOS-*luc* CD133^{bajo} de control (patas izquierdas). Cada sitio fue inyectado con el número indicado de células (10²-10⁵); se realizó evaluación luminiscente 90 días después de la inyección.

La Figura 17 es un gráfico que representa la expresión del ARN mensajero (ARNm) de CD 133 en células SaOS2 CD133^{bajo} transfectadas con oligonucleótidos miR-1, miR-10b y miR-133a. La alteración de estos miARN no alteró los niveles de expresión de CD 133. También se hace una comparación con células CD133^{alto} transfectadas con oligonucleótido miR-CN (control negativo) (*n* = 3 por grupo).

La Figura 18 es un gráfico que representa la expresión de miR-133a en poblaciones CD133^{alto} de biopsias de pacientes recién resecadas.

La Figura 19 es una serie de microfotografías y un gráfico de barras relacionado que representan los efectos de miARN individuales, y diversas combinaciones de los miARN, sobre la invasividad de células SaOS2 CD133^{bajo} transfectadas con los miARN indicados. Para fines de comparación también se presentan datos para células SaOS2 CD133^{alto}. CN, control negativo.

La Figura 20 es una serie de microfotografías y gráficos de barras relacionados que representan los efectos de miARN individuales, y diversas combinaciones de los miARN, sobre la invasividad de células MNNG/HOS CD133^{bajo} transfectadas con los miARN indicados. CN, control negativo.

La Figura 21 es un gráfico de barras que representa la proliferación de células SaOS2 CD133^{alto} no transfectadas y células SaOS2 CD133^{bajo} transfectadas con los miARN indicados. CN, control negativo. Las células se mantuvieron en cultivo durante 4 d antes del recuento.

La Figura 22 comprende tres gráficos que representan (izquierda) inducción de ARNm para CD133 por doxorrubicina (DOX) y cisplatino (CDDP) en células 143B; (central) inducción de miR-1, miR-10b y miR-133a por DOX en células 143B; y (derecha) inducción de miR-1, miR-10b y miR-133a por CDDP en células 143B (**P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001).

La Figura 23 es un par de imágenes fotográficas yuxtapuestas que representan la tumorigenicidad de células HOS-*luc* CD133^{bajo} tratadas con cisplatino (CDDP) en ratones. La luminiscencia de los tumores con xenoinjertos de células tratadas con CDDP (tibia derecha de los animales) y células de control tratadas con solución salina (tibia izquierda de los animales) se identifica mediante el sistema de captura de imágenes *in vivo* (IVIS). Las células CD133^{bajo} tratadas con CDDP formaron tumores desde tan solo 100 células (*n* = 5 por grupo).

La Figura 24 es un gráfico que representa la atenuación de la expresión de miR-1, miR-10b y miR-133 en células SaOS2 CD133^{alto} transfectadas con oligonucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA)-1, LNA-10b, LNA-133a y LNA-CN.

La Figura 25 es un gráfico que representa la proliferación celular el día 4 después de la transfección de los oligonucleótidos de LNA-133a y LNA-CN (control negativo) en células CD133^{alto} y CD133^{bajo} (*n* = 3 por grupo; ****P* < 0,001).

La Figura 26 es un par de gráficos que representan (izquierda) la viabilidad celular de los tipos celulares

indicados que crecen en presencia de doxorrubicina (DOX, 0,4 μ M, 48 h) o cisplatino (CDDP, 5 μ M, 48 h) medida 24 h después de la transfección con LNA-133a o LNA-CN; y (derecha) el porcentaje de células apoptóticas en los tipos celulares indicados que han crecido en presencia (+) o ausencia (-) de cisplatino (CDDP, 5 μ M, 48 h) medido 24 h después de la transfección con LNA-133a o LNA-CN.

La Figura 27 es un gráfico que representa ensayos de invasión en poblaciones indicadas de SaOS2 CD133^{alto} y CD133^{bajo} tratadas con LNA (n = 3 por grupo; **P<0,01).

La Figura 28 es un gráfico que representa el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) de genes asociados con la gravedad, resistencia a fármacos, y metástasis de osteosarcoma en células CD133^{alto} transfectadas con oligonucleótidos LNA-133a y LNA-CN. Se utilizó β -actina como control interno.

La Figura 29 es un esquema que representa el programa de administración de LNA-133a (LNA) y cisplatino (CDDP) para ratones que portan 143B-*luc*. IVIS, sistema de captura de imágenes *in vivo*.

La Figura 30 es un gráfico que representa la expresión de miR-133a en tumores 143B-*luc* según la dosis de LNA-133a (n = 3 por grupo).

La Figura 31 es un gráfico que representa la expresión relativa de miR-133a en ratones que portan tumores 143B-*luc* y tratados con solución salina sola, LNA-133a solo, cisplatino (CDDP) solo o LNA-133 más CDDP (*P < 0,05, ***P < 0,001).

La figura 32 es un grupo de cuatro imágenes fotográficas que representan el aspecto macroscópico, el día 36, de ratones que portan tumores 143B-*luc* y tratados con solución salina sola, LNA-133a solo, cisplatino (CDDP) solo o LNA-133 más CDDP. Barra de escala, 10 mm.

La Figura 33 es un gráfico que representa el peso de tumores 143B-*luc*, el día 36, de cada grupo de tratamiento indicado (**P< 0,01).

La Figura 34 es un gráfico que representa la supervivencia de ratones que portan tumores 143B-*luc* y tratados con solución salina sola, LNA-133a solo, cisplatino (CDDP) solo o LNA-133 más CDDP. Análisis de Kaplan-Meier y prueba de rangos logarítmicos (n = 5 por grupo, P = 0,0013).

La Figura 35 es un esquema que representa una estrategia utilizada para identificar genes diana de miR-133a. IP anti-Ago2, inmunoprecipitación de anticuerpos anti-Ago2.

La Figura 36 es un diagrama de Venn que representa ARN mensajeros (ARNm) diana candidatos de miR-133a según la micromatriz de ADN complementario (ADNc) y el análisis de la base de datos por ordenador.

La Figura 37 es un gráfico que representa la inhibición del crecimiento celular por 10 ARNip en matrices de transfección de células en presencia de cisplatino 72 h después de la transfección (n = 3 por grupo; CN, control negativo; **P< 0,01, ***p< 0,001).

La Figura 38 es un gráfico que representa el ensayo de invasión por 10 ARNip en matrices de transfección de células 72 h después de la transfección (n = 3 por grupo; CN, control negativo; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P< 0,001).

La Figura 39 es un gráfico que representa actividad luciferasa en células SaOS2 cotransfectadas con oligonucleótidos de miR-133a e indicadores de luciferasa para los genes diana de miR-133a potenciales indicados.

La Figura 40 es un gráfico que representa la correlación inversa entre la expresión de CD133 (CD133^{alto} frente a CD133^{bajo}) y ARN mensajero (ARNm) para las dianas indicadas de miR-133a, medida por reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR).

La Figura 41 es un gráfico que representa expresión reducida del ARN mensajero (ARNm) para los genes diana de miR-133a indicados en células SaOS2 CS133^{bajo} 48 h después de la transfección de oligonucleótidos de miR-133a en comparación con oligonucleótidos de miR-CN (control negativo), medida por reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR).

La Figura 42 es un gráfico que representa expresión aumentada de ARN mensajero (ARNm) para SGMS2 en tumores 143B-*luc* de ratones tratados con LNA-133a (**P < 0,01).

La Figura 43 es una serie de seis gráficos que representan la supervivencia sin metástasis de pacientes con osteosarcoma en los que se han detectado genes diana de miR-133a SGMS2, UBA2, SNX30, DUSP11, MAST4 y ANXA2, respectivamente. La baja expresión de las dianas directas de miR-133a (excepto para DUSP11) se

correlacionó significativamente con un mal pronóstico (análisis de Kaplan-Meier y prueba de rangos logarítmicos; valores de p como se muestra).

Descripción detallada de la invención

Desde la propuesta de la hipótesis de las células madre del cáncer (CSC), se han realizado varios estudios para identificar células madre cancerosas de osteosarcoma. Estas células se han detectado en clones esféricos en condiciones de cultivo independientes de anclaje, privadas de suero, como células de la población lateral (SP) basándose en el flujo de salida del colorante Hoechst 33342 o como células CD117 y stro-1 clasificadas utilizando un marcador de superficie celular. En vista de estos modelos, los inventores identificaron que Proliferin-1, el homólogo de ratón de CD133 humano, está muy expresada en una pequeña fracción de células de osteosarcoma. Las células de esta fracción de CD133^{alto} formaron esferas agrupadas en un entorno independiente del anclaje, mostraron potencial de autorrenovación y diferenciación, expresaron marcadores asociados con células madre y mostraron más potencial invasivo en comparación con la fracción de CD133^{bajo}.

Tras la caracterización del fenotipo de CSC de osteosarcoma, los inventores perfilaron la expresión de varios miARN, que distinguen células de la fracción de CD133^{alto} de su descendencia más diferenciada. Entre estos miARN, se encontró que miR-1, miR-1 Ob, miR-133a estaban regulados positivamente en la fracción de CD133^{alto} en comparación con la fracción de CD133^{bajo} de las células del osteosarcoma. Notablemente, los inventores han descubierto que estos miARN promueven la quimiorresistencia y la invasividad de las células del osteosarcoma. Estas observaciones sugieren que miR-1, miR-1 Ob y miR-133a son reguladores de las células madre cancerosas del osteosarcoma. Particularmente en combinación con un sistema de administración de fármacos a medida, nuevos agentes terapéuticos (por ejemplo, nucleótidos antisentido) dirigidos a los miARN son muy prometedores contra el osteosarcoma, añadiéndose a agentes quimioterapéuticos convencionales, tales como metotrexato, cisplatino y doxorubicina.

Aunque no se utilizan actualmente miARN como productos terapéuticos contra el cáncer o como dianas validadas para productos terapéuticos contra el cáncer, estudios *in vivo* exitosos apoyan la idea de que podrían utilizarse como productos terapéuticos innovadores para abordar las necesidades no satisfechas. La administración sistémica de anti-miR-10b en un modelo de ratón ortotópico de cáncer de mama mostró una reducción significativa en el número y tamaño de las metástasis pulmonares, sin ningún efecto evidente sobre los tumores primarios. Ma *et al.* (2010) Nat Biotechnol 28: 341-7. Por otra parte, el reciente descubrimiento de miARN como nuevos biomarcadores en suero o plasma representa un nuevo enfoque para la exploración de diagnóstico en sangre. Brase *et al.* (2010) Mol Cancer 9: 306. Los miARN identificados de acuerdo con la presente invención también tienen potencial como biomarcadores que pueden usarse para una evaluación rápida de la sensibilidad a productos quimioterapéuticos, detección precoz de recidiva local o metástasis a distancia, todos los cuales son factores que afectan al pronóstico para los pacientes con osteosarcoma.

Un aspecto de la invención es una cantidad eficaz de una molécula antisentido específica para un microARN (miARN) seleccionado de miR-1, miR-10b y miR-133a para su uso en el tratamiento del osteosarcoma en un sujeto que lo necesite.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratando" y "tratar" se refieren a mejorar o curar una enfermedad o afección indeseable. Por ejemplo, tratar osteosarcoma se refiere a reducir o eliminar la carga de células de osteosarcoma en un sujeto que tiene osteosarcoma.

Un "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a un mamífero. En una realización, un sujeto es un ser humano.

Una cantidad efectiva de una molécula antisentido específica para un microARN se administra al sujeto que necesita tratamiento. Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para lograr un resultado biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar un osteosarcoma es una cantidad suficiente para reducir o eliminar la población de células de osteosarcoma en un sujeto que tiene osteosarcoma. Una cantidad eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el tamaño del tumor, el tamaño del sujeto, la condición general del sujeto, la vía de administración, la identidad del agente activo, la composición o formulación del agente activo, y otros factores bien conocidos en las técnicas médicas y farmacéuticas.

Sin pretender quedar ligado a ninguna dosis particular, una cantidad eficaz puede, en general, variar de 0,01 microgramos (ug)/kg de peso corporal a 1000 mg/kg de peso corporal de agente activo por día cuando se administra por vía parenteral de administración. Para la administración oral o entérica, una cantidad eficaz puede, en general, variar de 0,1 µg/kg de peso corporal a 10.000 mg/kg de peso corporal de agente activo por día. Se puede determinar una cantidad eficaz, por ejemplo, basándose en estudios *in vitro* y estudios *in vivo* en animales, así como estudios clínicos.

Los microARN (miARN) son ARN no codificantes cortos (20-24 nt) que están implicados en la regulación postranscripcional de la expresión génica en organismos multicelulares al afectar tanto a la estabilidad como a la

traducción de ARNm. Los miARN se transcriben mediante ARN polimerasa II como parte de transcritos primarios con caperuza y poliadenilados (pri-miARN) que pueden ser codificantes o no codificantes de proteínas. El transcrito primario se escinde mediante la enzima ribonucleasa III Drosha para producir un miARN precursor (pre-miARN) de tallo-bucle de aproximadamente 70 nt, que se escinde adicionalmente mediante la ribonucleasa Dicer citoplásmica para generar los productos de miARN maduro y miARN* antisentido (miARN*). El miARN maduro se incorpora en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que reconoce ARN mensajeros (ARNm) diana a través de la formación de pares de bases imperfectas con el miARN y con mayor frecuencia da como resultado inhibición de la traducción o desestabilización del ARNm diana.

El miARN se puede seleccionar de miR-1, miR-10b y miR-133a. En una realización, el miARN es miR-1. En una realización, el miARN es miR-10b. En una realización, el miARN es miR-133a. Aunque estos miARN se han descrito en la técnica, antes de la presente invención no se reconocía ni se esperaba que estos miARN particulares estuvieran o pudieran estar asociados con osteosarcoma, incluyendo, en particular, fenotipos resistentes a fármacos y/o agresivamente invasivos o metastásicos de osteosarcoma.

miR-1 se ha descrito como un miARN de 22 nucleótidos de longitud que tiene la secuencia 5'-UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU-3' (SEQ ID NO: 1).

miR-10b se ha descrito como un miARN de 23 nucleótidos de longitud que tiene la secuencia 5'-UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG-3' (SEQ ID NO: 2).

miR-133a se ha descrito como un miARN de 22 nucleótidos de longitud que tiene la secuencia 5'-UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG-3' (SEQ ID NO: 3).

El antisentido está bien descrito en la bibliografía. En general, los agentes antisentido son moléculas basadas en ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de una molécula de ácido nucleico diana, por lo que la asociación entre la molécula antisentido y su molécula de secuencia diana da como resultado una cantidad reducida de expresión de la molécula de ácido nucleico diana.

En una realización, la molécula antisentido (anti-miARN) es un ARN estabilizado, es decir, un ARN que, en comparación con ARN de origen natural, es relativamente resistente a la degradación mediada por nucleasa *in vitro* o *in vivo*. Se conocen numerosas formas de ácidos nucleicos estabilizados, incluyendo ARN. Algunos ARN estabilizados incluyen extremos poli A 3'-terminales. Se han descrito bien formas químicamente modificadas de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos con cadena principal de fosforotioato modificada y ácidos nucleicos de 2'-O-metilo (2'-OMe) y no requieren más descripción aquí. Krutzfeldt *et al.* (2005) Nature 438:685-9; Ma *et al.* (2010) Nat Biotechnol 28:341-7.

En una realización, la molécula antisentido es un oligonucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA). Un nucleótido de ácido nucleico bloqueado es un ribonucleótido modificado. El resto de ribosa de un nucleótido de LNA se modifica con un enlace adicional que conecta el oxígeno 2' y el carbono 4'. El enlace "bloquea" la ribosa en la conformación 3'-endo. Los nucleótidos de LNA fueron desarrollados por primera vez por Imanishi y colaboradores y Wengel y colaboradores. Obika *et al.* (1997) Tetrahedron Lett. 38: 8735-8; Koshkin *et al.* (1998) Tetrahedron 54: 3607-30.

Un oligonucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA) es un polímero de nucleótidos, al menos uno de los cuales es un nucleótido de LNA. Cualquier nucleótido no LNA en un oligonucleótido de LNA puede ser un ribonucleótido o desoxirribonucleótido de origen natural o modificado, o un análogo del mismo, siempre que el oligonucleótido de LNA sea funcional como una molécula antisentido con respecto a su diana prevista. En una realización, cualquier nucleótido no LNA en un oligonucleótido de LNA es un desoxirribonucleótido y al menos el nucleótido 3' terminal es un nucleótido de LNA. En una realización, cualquier nucleótido no LNA en un oligonucleótido de LNA es un desoxirribonucleótido de origen natural y al menos los dos nucleótidos 3' terminales son nucleótidos de LNA. En una realización, un oligonucleótido de LNA se compone exclusivamente de nucleótidos de LNA.

En una realización, la molécula antisentido es ADN.

En una realización, una molécula antisentido específica para miR-1 comprende una secuencia 5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4).

En una realización, la secuencia de una molécula antisentido específica para miR-1 es 5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4).

En una realización, una molécula antisentido específica para miR-10b comprende una secuencia 5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5).

En una realización, la secuencia de una molécula antisentido específica para miR-10b es 5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5).

En una realización, una molécula antisentido específica para miR-133a comprende una secuencia 5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6).

5 En una realización, la secuencia de una molécula antisentido específica para miR-133a es 5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6).

En una realización, una molécula antisentido específica para miR-1 comprende una secuencia 5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7).

10 En una realización, la secuencia de una molécula antisentido específica para miR-1 es 5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7).

En una realización, una molécula antisentido específica para miR-10b comprende una secuencia 5'-CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8).

15 En una realización, la secuencia de una molécula antisentido específica para miR-10b es 5'-CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8).

En una realización, una molécula antisentido específica para miR-133a comprende una secuencia 5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9).

20 En una realización, la secuencia de una molécula antisentido específica para miR-133a es 5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9).

En una realización, una molécula antisentido específica para miR-1 comprende una secuencia 5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10).

25 En una realización, la secuencia de una molécula antisentido específica para miR-1 es 5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10).

En una realización, una molécula antisentido específica para miR-10b comprende una secuencia 5'-CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11).

30 En una realización, la secuencia de una molécula antisentido específica para miR-10b es 5'-CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11).

En una realización, una molécula antisentido específica para miR-133a comprende una secuencia 5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12).

35 En una realización, la secuencia de una molécula antisentido específica para miR-133a es 5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12).

La invención abarca además moléculas antisentido de 20 a 30 nucleótidos de longitud que comprenden una secuencia contigua que es al menos el 90 por ciento idéntica a una cualquiera de las secuencias de moléculas antisentido anteriores. Debe entenderse que tales moléculas antisentido son capaces de hibridar específicamente con o atenuar la expresión de los miARN a los que están dirigidos.

45 La invención abarca además moléculas antisentido de 21 a 30 nucleótidos de longitud que comprenden una secuencia contigua que es al menos el 95 por ciento idéntica a una cualquiera de las secuencias de moléculas antisentido anteriores. Debe entenderse que tales moléculas antisentido son capaces de hibridar específicamente con o atenuar la expresión de los miARN a los que están dirigidos.

En cada una de las realizaciones anteriores, en una realización, la molécula antisentido incluye uno o más nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA). Asimismo, en una realización, la molécula antisentido está compuesta exclusivamente por nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA).

55 En una realización, la molécula antisentido específica para un microARN particular está asociada con un vehículo de suministro de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un "vehículo de suministro de ácido nucleico" se refiere a un vector biológicamente compatible útil para administrar una molécula de ácido nucleico al citoplasma de una célula. La molécula antisentido puede conjugarse con el vehículo de suministro de ácido nucleico. Como alternativa o además, la molécula antisentido puede estar encapsulada por el vehículo de suministro de ácido nucleico. Los ejemplos de vehículos de suministro de ácido nucleico adecuados incluyen liposomas, lípidos, colesterol, hormonas y otras moléculas de dirección. Con respecto a los liposomas, la molécula antisentido puede estar asociada con la superficie externa del liposoma, el interior del liposoma o tanto el exterior como el interior del liposoma.

En una realización, el osteosarcoma es osteosarcoma localizado, por ejemplo, osteosarcoma que está limitado a una extremidad o un hueso.

En una realización, el osteosarcoma es osteosarcoma metastásico.

Un aspecto de la invención es un método para evaluar la resistencia del osteosarcoma a una terapia antineoplásica en una muestra de tejido que comprende células de osteosarcoma. El método incluye las etapas de aislar de la muestra células que expresan CD133; medir un primer nivel de expresión por las células que expresan CD133 de al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a; poner en contacto las células que expresan CD133 con una terapia antineoplásica; y medir un segundo nivel de expresión por las células que expresan CD133 de al menos un miARN, en donde un segundo nivel de expresión mayor que el primer nivel de expresión indica que el osteosarcoma es resistente a la terapia antineoplásica.

Pueden aislarse células que expresan CD133 de una muestra de tejido usando cualquier medio adecuado. Por ejemplo, se puede preparar una suspensión celular a partir del tejido y después las células pueden someterse a inmunocromatografía con, por ejemplo, perlas magnéticas cargadas con anticuerpo anti-CD133, o por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando un anticuerpo anti-CD133 marcado de forma apropiada. Están disponibles en el mercado anticuerpos monoclonales anti-CD133 humano de varios proveedores.

Se puede realizar un nivel de expresión de un miARN utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, el nivel de expresión puede determinarse utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizando cebadores oligonucleotídicos seleccionados de forma apropiada.

Como alternativa o además, el nivel de expresión puede determinarse usando transferencia Northern con una sonda de hibridación seleccionada y marcada de manera apropiada.

Como se usa en el presente documento, una "terapia antineoplásica" se refiere a cualquier modalidad de tratamiento útil para tratar un cáncer. Dichas modalidades incluyen, en general, quimioterapia, radioterapia de haz externo, inmunoterapia, terapia hormonal y combinaciones de las mismas.

Son agentes quimioterapéuticos moléculas pequeñas (peso molecular inferior a aproximadamente 1 kDa) que son bien conocidas en la técnica médica. Los agentes quimioterapéuticos usados habitualmente para el osteosarcoma incluyen cisplatino (cis-diaminodicloroplatino (II), también conocido como CDDP y cisplatino, disponible en el mercado como Platinol y Platinol-AQ), doxorrubicina (también conocida como hidroxidaunorubicina, disponible en el mercado como Adriamicina) y metotrexato (también conocido como ametofterina). En una realización, la terapia antineoplásica se selecciona de cisplatino, doxorrubicina, metotrexato y cualquier combinación de los mismos. Se pueden usar dos o más de estos agentes en combinación, ya sea simultánea o secuencialmente. Además, puede usarse una cualquiera o una combinación de dichas terapias antineoplásicas en combinación con otra modalidad antineoplásica, por ejemplo, radioterapia de haz externo.

En diversas realizaciones, el osteosarcoma se identifica como resistente a la terapia antineoplásica cuando el segundo nivel de expresión de al menos uno de miR-1, miR-10b y miR-133a es objetivamente mayor que el primer nivel de expresión. En diversas realizaciones, el osteosarcoma se identifica como resistente a la terapia antineoplásica cuando el segundo nivel de expresión de al menos uno de miR-1, miR-10b y miR-133a es al menos 10 por ciento, al menos 20 por ciento, al menos 30 por ciento, al menos 40 por ciento, al menos 50 por ciento, al menos 60 por ciento, al menos 70 por ciento, al menos 80 por ciento, al menos 90 por ciento o al menos 100 por ciento mayor que el primer nivel de expresión.

En una realización, el método comprende además la etapa de ajustar la dosis o cambiar la terapia antineoplásica cuando se encuentra que el osteosarcoma es resistente a la terapia antineoplásica. Por ejemplo, cuando se encuentra que el osteosarcoma es resistente a la terapia antineoplásica, la terapia antineoplásica se puede complementar con o cambiar a otra terapia antineoplásica adecuada.

Un aspecto de la invención es un método de detección del osteosarcoma en una muestra de tejido obtenida de un sujeto. El método incluye la etapa de realizar en una muestra de tejido obtenida de un sujeto un ensayo específicamente capaz de detectar al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a, en donde la detección por el ensayo de la presencia en la muestra del al menos un miARN indica que el sujeto está en riesgo de tener osteosarcoma. En una realización, el miARN es miR-1. En una realización, el miARN es miR-10b. En una realización, el miARN es miR-133a. En una realización, el al menos un miARN es cualquier combinación de miR-1, miR-10b y miR-133a.

Un ensayo específicamente capaz de detectar al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a puede ser, por ejemplo, RT-PCR que utiliza cebadores oligonucleotídicos seleccionados de forma apropiada. Como alternativa o además, el ensayo puede ser transferencia Northern con una

sonda de hibridación marcada y seleccionada de forma apropiada.

En una realización, el tejido es sangre. En una realización, el tejido es suero. En una realización, el tejido es plasma.

5 En una realización, el método incluye además la etapa de verificar la presencia de osteosarcoma, usando cualquier método adecuado, cuando se determina que el sujeto está en riesgo de tener osteosarcoma. Por ejemplo, la verificación de la presencia de osteosarcoma puede incluir la realización de un estudio esquelético o un análisis específico de captura de imágenes óseas usando rayos X u otra técnica adecuada de captura de imágenes óseas, captura de imágenes mediante resonancia magnética (IRM), tomografía computarizada (TC), biopsia y cualquier combinación de los mismos.

Tras un método de selección, un sujeto puede ser tratado de osteosarcoma.

15 Un aspecto de la invención es un método para controlar el osteosarcoma en una muestra de tejido obtenida de un sujeto que tiene osteosarcoma o que ha sido tratado de osteosarcoma, comprendiendo el método (a) realizar un ensayo específicamente capaz de cuantificar el nivel de expresión de al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a; y (b) repetir la etapa (a) en una muestra de tejido obtenida posteriormente del sujeto, en donde un nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida posteriormente mayor que el nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida anteriormente indica que el osteosarcoma es progresivo y un nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida posteriormente menor que el nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida anteriormente indica que el osteosarcoma es regresivo.

25 Un ensayo específicamente capaz de cuantificar el nivel de expresión de al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a puede ser, por ejemplo, RT-PCR que utiliza cebadores oligonucleotídicos seleccionados de forma apropiada.

En una realización, el tejido es sangre. En una realización, el tejido es suero. En una realización, el tejido es plasma.

30 La dosis de la terapia antineoplásica se puede ajustar o cambiar cuando se encuentra que el osteosarcoma es progresivo. Por ejemplo, cuando se encuentra que el osteosarcoma es progresivo, la terapia antineoplásica se puede complementar con o cambiar a otra terapia antineoplásica adecuada.

35 La dosis se puede ajustar o cambiar cuando se encuentra que el osteosarcoma es regresivo. Por ejemplo, cuando se encuentra que el osteosarcoma es regresivo, la terapia antineoplásica puede reducirse o incluso suspenderse, o la terapia antineoplásica puede cambiarse a otra terapia antineoplásica adecuada.

La invención, habiendo sido ahora divulgada en general, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

40 Ejemplos

Métodos generales

45 Purificación de células de osteosarcoma a partir de muestras clínicas nuevas. Se obtuvieron muestras nuevas de osteosarcoma humano de acuerdo con los principios éticos del comité institucional sobre experimentación humana de dos pacientes a los que se les realizó una biopsia incisional de diagnóstico en los sitios primarios de osteosarcoma antes de la quimioterapia neoadyuvante en el Hospital del Centro Nacional del Cáncer de Japón entre octubre de 2010 y junio de 2011. El diagnóstico de osteosarcoma y los subtipos histológicos fueron determinados por patólogos certificados. Se obtuvieron muestras quirúrgicas en el momento de la resección y se recibieron en el laboratorio en 10 minutos, inmediatamente se desagregaron mecánicamente y se digirieron con collagenasa y (gelatina Nitta) y se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) dos veces. Se obtuvieron suspensiones unicelulares por filtración a través de un filtro de 70 µm (BD Biosciences), las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10 % (Gibco BRL) y penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) con CO₂ al 5 % en una incubadora humidificada a 37 ° C.

60 Células y cultivo celular. La línea celular Hu09 de osteosarcoma humano se estableció previamente en el laboratorio del solicitante. Las líneas celulares de osteosarcoma humano SaOS2, U2OS, MG63, HOS, MNNG/HOS y 143B se adquirieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La línea celular de riñón embrionario transformado 293 también se obtuvo de la ATCC. Las células SaOS2 y Hu09 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco BRL). Las células U2OS, MG63, HOS, MNNG/HOS, 143B y 293 se cultivaron en DMEM (Invitrogen). Todos los medios se complementaron con un FBS inactivado por calor al 10 % (Gibco BRL) y penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Las células se mantuvieron en CO₂ al 5 % en un incubador humidificado a 37 ° C.

65 Clasificación celular y citometría de flujo. Se realizó clasificación celular por citometría de flujo en líneas celulares de

osteosarcoma y muestras clínicas utilizando anti-CD133/2 humano monoclonal de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (293C3, Miltenyi Biotec) y anti-CD44 humano monoclonal de ratón conjugado con alofocianina (APC) (eBioscience). IgG1κ-PE de ratón de control de isotipo (eBioscience) actuó como control. Las muestras se analizaron y clasificaron en el clasificador celular JSAN (Baybioscience) y el BD FACS Arianal (BD Biosciences). La viabilidad se evaluó utilizando la exclusión de azul de tripano. Los resultados se analizaron con el software FlowJo (Tree Star).

Ensayo de proliferación celular y citotoxicidad. Las tasas de proliferación celular y la viabilidad celular como un indicador de la sensibilidad relativa de las células a doxorubicina, cisplatino y metotrexato se determinaron utilizando el sistema de ensayo de proliferación celular TetraColor ON E (Seikagaku) según las instrucciones del fabricante. Se sembraron células que crecieron en la fase logarítmica en placas de 96 pocillos (5×10^3 /pocillo), se permitió que se unieran durante una noche y después se trataron con dosis variables de doxorubicina (Sigma), cisplatino (Alexis) y metotrexato (Sigma) durante 72 h. Se utilizaron pocillos por triplicado para cada grupo de tratamiento. La absorbancia se midió a 450 nm con una longitud de onda de referencia a 650 nm en EnVision (Wallac). El número relativo de células viables se expresó como el porcentaje de viabilidad celular.

Formación de esferas. Se sembraron células de osteosarcoma en placas a 5.000-10.000 células/pocillo en 300 µl de medio DMEM/F12 sin suero (Invitrogen), complementado con factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (EGF) 20 ng/ml (Sigma-Aldrich), factor de crecimiento de fibroblastos básicos recombinantes humanos (bFGF) 10 ng/ml (Invitrogen), insulina 4 µg/ml (Sigma-Aldrich), B-27® (1:50; Invitrogen), penicilina 500 unidades/ml (Invitrogen) y estreptomina 500 µg/ml (Invitrogen). Las células se cultivaron en suspensión en placas de fijación ultra baja de 24 pocillos (Corning). Las células se abastecieron con 30 µl de medio complementado cada dos días. Las esferas se contaron el día 5 en pocillos por triplicado. Se llevó a cabo cultivo celular a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %.

Ensayo de invasión. Se realizaron ensayos de invasión utilizando cámaras de invasión BD BioCoat de 24 pocillos con Matrigel (Becton-Dickinson). Se añadieron 1×10^5 células, suspendidas en 500 µl de medio DMEM o RPMI1640 sin FBS, a la cámara superior y se añadió medio DMEM o RPMI 1640 con FBS al 10 % a la cámara inferior. Después de incubación durante 24 horas o 36 horas, las células en la superficie superior del filtro se retiraron por completo frotándolas con hisopos de algodón. Los filtros se fijaron en metanol y se tiñeron con azul de toluidina al 1% en tetraborato de sodio al 1% (Sysmex). Después, los filtros se montaron en portaobjetos y se contaron las células en las superficies inferiores. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Perfil de miARN. El perfil de expresión de miARN se realizó utilizando micromatrices de miARN fabricadas por Agilent Technologies (Santa Clara, CA), conteniendo cada una 866 miARN humanos (Agilent Technologies [<http://www.chem.agilent.com/scripts/PHome.asp>]). Se usaron tres muestras de ARN extraídas de forma independiente de células de CD133^{alto} y CD133^{bajo} justo después del aislamiento para análisis de matrices en cada línea celular. Se realizaron marcaje e hibridación de muestras de ARN total según el protocolo del fabricante. Los resultados de las micromatrices se extrajeron usando el software Agilent Feature Extraction (v10.7.3.1) y se analizaron usando el software GeneSpring GX 11.0.2 (Agilent Technologies).

Muestras clínicas para estudios de correlación de supervivencia de CD133, miR-133a y dianas de miR-133a. Se obtuvieron muestras de tejido de osteosarcoma mediante biopsia incisional de diagnóstico en los sitios primarios de osteosarcoma antes de la quimioterapia neoadyuvante en el Hospital del Centro Nacional del Cáncer de Japón entre junio de 1997 y septiembre de 2010. Se excluyeron los pacientes mayores de 40 años y con tumores primarios ubicados fuera de las extremidades. Cada muestra de tumor nueva se cortó en dos trozos, uno de los cuales se crioconservó inmediatamente en nitrógeno líquido y el otro se fijó con formalina. El diagnóstico de osteosarcoma y los subtipos histológicos fueron determinados por patólogos certificados. Solo se incluyeron muestras de osteosarcoma con los subtipos histológicos osteoblástico, condroblástico, fibroblástico y telangiectásico. La respuesta a la quimioterapia se clasificó como buena si el grado de necrosis tumoral era del 90 % o mayor. Para los estudios de correlación de supervivencia de CD133 y las dianas de miR-133a, se utilizaron 35 muestras de ADNc disponibles de la biblioteca de ADNc, mientras que se utilizó ARN de 48 muestras fijadas en formalina, incluidas en parafina (FFPE) disponibles para el estudio de correlación de miR-133a. La información clínica de los pacientes se incluye en las Tablas 7 y 10 (posteriormente). Todos los pacientes proporcionaron un consentimiento informado por escrito que autoriza la recogida y el uso de sus muestras para fines de investigación. El protocolo de estudio para obtener información clínica y recoger muestras fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Centro Nacional del Cáncer de Japón.

Aislamiento de RNA y RT-PCR cuantitativa en tiempo real de ARNm y miARN. Se purificó ARN total a partir de células y tejidos tumorales con un Mini Kit RNeasy y un conjunto de DNasa sin RNasa (QIAGEN). Para reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) de ARNm, se sintetizó ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). Para cada reacción de qPCR, se mezclaron cantidades iguales de ADNc con Platinum SYBER Green qPCRSuperMix (Invitrogen) y cebadores específicos (Tabla 1). Los niveles de expresión génica se normalizaron por beta actina (ACTB) o gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para qPCR de miARN, se convirtió miARN en ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de microARN de TaqMan (Applied Biosystems). Se amplificó ARN nuclear pequeño de RNU6B como control interno. Se realizó qPCR utilizando cada sonda específica de miARN incluida con el ensayo de microARN de TaqMan en un sistema de PCR

en tiempo real 7300 y software SDS (Applied Biosystems).

Tabla 1. Secuencias de cebadores para análisis de RT-PCR en tiempo real.

Gen	Dir/Inv	Secuencia (5'-Secuencia-3')	SEQ ID NO:
CD133	Dir	GGACCCATTGGCATTCTC	13
	Inv	CAGGACACAGCATAGAATAATC	14
Oct3/4	Dir	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA	15
	Inv	ACACTCGGACCACATCCTTC	16
Nanog	Dir	CAGTCTGGACACTGGCTGAA	17
	Inv	CTCGCTGATTAGGCTCCAAC	18
Sox2	Dir	TGGTACGGTAGGAGCTTTGC	19
	Inv	TTTTTCGTCGCTTGGAGACT	20
ABCB1	Dir	CATGCTCCCAGGCTGTTTAT	21
	Inv	GTAACCTGGCAGTTTCAGTG	22
AGCG2	Dir	TGCAACATGTACTGGCGAAGA	23
	Inv	TCTTCCACAAGCCCCAGG	24
ABCC2	Dir	ACAGAGGCTGGTGGCAACC	25
	Inv	ACCATTACCTTGTCACTGTCCATGA	26
ezrina	Dir	CGGGACAAGTACAAGGCACTGCGGCAGATCCGG	27
	Inv	CCGGATCTGCCGCACTGCCTTGTACTCCG	28
integrina β 4	Dir	TGACGATCTGGACAACCTCAAGCA	29
	Inv	ATCCAATGGTGTAGTCGCTGGTGA	30
MMP13	Dir	GATACGTTCTTACAGAAGGC	31
	Inv	ACCCATCTGGCAAATAAAC	32
CXCR4	Dir	GGAGGGGATCAGTATATACA	33
	Inv	GAAGATGATGGAGTAGATGG	34
SGMS2	Dir	CAATTCCTTGCTGCTTCTCC	35
	Inv	GCCTTTGTTTTGCTCCTCAG	36
UBA2	Dir	AAAAAGGGTGTGACCGAGTG	37
	Inv	GCATCTTCTTCCCCAAACAA	38
SNX30	Dir	CCTGAACGCCTACAAGAAGC	39
	Inv	ATGGTTCCCAGTTTGAGTGC	40
DOLPP1	Dir	GAGAGGAGTGAGGCAACAGG	41
	Inv	ACCCAGACACAGGTTTGAG	42
DUSP11	Dir	GAGACGCGACTTTTCAGGAC	43
	Inv	GATCCAAAGGGGAAAAGCAT	44
CUL4B	Dir	GTTCTGGCGAAAAATCCAAA	45
	Inv	TCGAACAATTGCAGCATCA	46
ROD1	Dir	CATTCTGGGGCTAGTGGTA	47
	Inv	CCATCTGAACCAAGGCATTT	48
ZNF701	Dir	ATCCCGTGGAGTGAAGGTC	49
	Inv	TCTCCAGCATCACGTCTCTG	50
MAST4	Dir	AGCCCATTTTTCATTTGCAC	51
	Inv	TCGTCTGGTGTGTTGGTGGTA	52
ANXA2	Dir	CCTGAGCGTCCAGAAATGG	53
	Inv	GGACTGTTATTCGCAAGCTGGTT	54
ACTB	Dir	CATGAAGTGTGACGTGGACA	55
	Inv	CACGGAGTACTTGCGCTCAG	56
GAPDH	Dir	GACTTCAACAGCGACACCC	57
	Inv	GCCAAATTCGTTGTCATACCA	58

negativo (CN; Applied Biosystems, Tabla 2) y ácidos nucleicos bloqueados (LNA) (LNA-1, -10b, -133a y control negativo, Exiqon, Tabla 3) se transfectaron en cada tipo de células a 30 nM cada una (concentración final) utilizando DharmaFECT 1 (GE Healthcare). Se transfectaron ARNip sintéticos (Bonac corporation, Tabla 4) en cada tipo de células a 100 nM cada una (concentración final) utilizando DharmaFECT 1 (GE Healthcare). Después de 24 horas de incubación, las células se trataron con agentes quimioterapéuticos para ensayo de citotoxicidad o se volvieron a sembrar en cámaras de invasión para el ensayo de invasión.

Tabla 2. Secuencias de productos de miARN

miARN	Con sentido/Antisentido	Secuencia (5'-Secuencia-3')	SEQ ID NO:
hsa-miR-1-2	Con sentido	UGGAAUGUAAAGAAGUAUUGUAU	1
	Antisentido	UACAUACUUCUUAUGUACCC	59
hsa-miR-10b	Con sentido	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	2
	Antisentido	ACAGAUUCGAUUCUAGGGGAU	60
hsa-miR-133a-1	Con sentido	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	3
	Antisentido	AGCUGGUAAAAUGGAACCAAAU	61

Tabla 3. Secuencias de productos de LNA

miARN	Secuencia (5'-Secuencia-3')	SEQ ID NO:
hsa-miR-1-2	ACATACTTCTTTACATTCCA	10
hsa-miR-10b	ACAAATTCGGTTCTACAGGGT	11
hsa-miR-133a-1	CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA	12

Tabla 4. Secuencias de ARNip

Gen	Con sentido/Antisentido	Secuencia (5'-Secuencia-3')	SEQ ID NO:
SGMS2	Con sentido	CCACUAGAGUGGUGGAAAAdTdT	62
	Antisentido	UUUCCACCACUCUAGUGGdTdT	63
UBA2	Con sentido	GGACUGGGCUGAAGUACAAdTdT	64
	Antisentido	UUGUACUUCAGCCCAGUCCdTdT	65
SNX30	Con sentido	CCGAGAAGUUUGUGGUAAAdTdT	66
	Antisentido	UUUACCACAAACUUCUCGGdTdT	67
DOLPP	Con sentido	CUUCCUAAUCCGAGACACAdTdT	68
	Antisentido	UGUGUCUCGGAUUAGGAAGdTdT	69
DUSP11	Con sentido	CCAGAGGAUUUGCCAGAAAdTdT	70
	Antisentido	UGUGUCUCGGAUUAGGAAGdTdT	71
CUL4B	Con sentido	GGUGAACACUUAACAGCAAdTdT	72
	Antisentido	UUGCUGUUAAGUGUUCACdTdT	73
ROD1	Con sentido	GGGAAUGACAGCAAGAAUdTdT	74
	Antisentido	AUUUCUUGCUGUCAUUCdTdT	75
ZNF701	Con sentido	CCAUAUGAAGGAGGUCUdTdT	76
	Antisentido	AAGACCUCCUUAUUAUGGdTdT	77
ANXA2	Con sentido	UGACCAAGAUGCUCGGGAUdTdT	78
	Antisentido	AUCCCGAGCAUCUUGGUCAAdTdT	79
MAST4	Con sentido	GGAGGUACCUUCUCCAAAdTdT	80
	Antisentido	UAUCAAACUCCUCUUCUGdTdT	81

Establecimiento de línea celular que expresa de forma estable miR-133a. Se construyeron vectores de miR-133a insertando secuencias de clonación que incluyen la longitud completa de las secuencias de microARN maduras en el vector pIRES-hyg (Clontech). Los vectores de microARN y control se transfectaron en células HOS CD133^{bajo} de osteosarcoma recién aisladas mediante co-precipitación con fosfato de calcio. Los transfectantes se dividieron y se cultivaron en medio selectivo con 200 µg/ml de higromicina. Se seleccionaron colonias resistentes a higromicina y se expandieron en un medio que contenía higromicina 200 µg/ml. Las secuencias de construcciones de miR-133a se confirmaron mediante secuenciación de ADN (secuenciador ABI 3130, Applied Biosystems) y se confirmó la sobreexpresión de microARN mediante qRT-PCR. RNU6B actuó como el control endógeno.

Experimentos de trasplante de tumores. Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices del Instituto de Investigación en Animales de Laboratorio, Instituto de Investigación del Centro Nacional del Cáncer. Se obtuvieron ratones desnudos o ratones NOD/SCID (CLEA Japón) a las 4 semanas de edad y se les dio al menos

- 1 semana para adaptarse a su nuevo entorno antes del trasplante de tumor. El día 0, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 3% y la pierna derecha se desinfectó con etanol al 70 %. Las células se aspiraron en una jeringa de tuberculina de 1 ml equipada con una aguja 27-G. La aguja se insertó a través de la corteza de la tuberosidad anterior de la tibia con un movimiento rotatorio para evitar la fractura cortical. Una vez que se atravesó el hueso, la aguja se insertó aún más para fracturar la corteza posterior de la tibia. Se inyectó un volumen de 100 μ l de solución que contenía HOS-Luc CD133^{alto} y CD133^{bajo} (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 células por sitio) o 143B-Luc ($1,5 \times 10^6$) recién aisladas mientras se movía lentamente hacia atrás la aguja.
- Supervisión del crecimiento del tumor, metástasis pulmonar y toxicidad con/sin LNA-anti-miR-133a. Para la evaluación de la tumorigenicidad entre células HOS-Luc CD133^{alto} y CD133^{bajo}, Se inyectó a ratones NOD/SCID D-luciferina (150 mg/kg, Promega) mediante inyección intraperitoneal. Diez minutos después, los fotones de luciferasa de luciérnaga se contaron utilizando el sistema de captura de imágenes IVIS (Xenogen Corp.) según las instrucciones del fabricante. Cada condición experimental incluía 5 animales por grupo y supervisión una vez a la semana. Para la evaluación de la administración de LNA-anti-miR-133a en metástasis pulmonar espontánea de ratones modelo de osteosarcoma, se inyectaron a ratones individuales 10 mg/kg de LNA-anti-miR-133a o solución salina a través de la vena de la cola. Se inyectaron LNA los siguientes días 4, 11, 18, 25 y 32 después de la inoculación de células 143B-Luc. Cada condición experimental incluía 10 animales por grupo. El desarrollo de metástasis pulmonar posterior se supervisó una vez a la semana *in vivo* mediante la captura de imágenes bioluminiscentes descrita anteriormente durante 5 semanas. Todos los datos se analizaron utilizando el software LivingImage (versión 2.50, Xenogen). El día 36, el tumor primario y el pulmón en 5 ratones de cada grupo se resecaron en la necropsia por los análisis del peso, bioluminiscente e histológico. Se realizaron el examen de sangre, peso del cuerpo completo, así como examen histopatológico del corazón, del hígado y del músculo esquelético para evaluar la toxicidad. Los ratones restantes se observaron durante su periodo de supervivencia.
- Recogida e identificación exhaustivas de ARNm diana de miR-133a. Para recoger dianas cadena abajo exhaustivas de miR-133a, se realizaron perfiles de micromatrices de ADNc a partir de dos enfoques experimentales. En primer lugar, se recogieron genes candidatos de un análisis de micromatrices de ADNc realizado a partir del ARN total recogido de células SaOS2 CD133^{bajo} transducidas con miR-133a o control negativo (CN). En segundo lugar, se realizó análisis de micromatrices de ADNc a partir de ARN total de inmunoprecipitación de anticuerpo anti-Ago2 (Ago2-IP) en células CD133^{bajo} transducidas con miR-133a o CN. Los genes regulados negativamente en el método anterior con una disminución de 1,5 veces y los genes regulados positivamente en el método anterior con un aumento de 2,0 veces se definieron como candidatos por referencia a las bases de datos informáticas TargetScanHuman 6.0 (<http://www.targetscan.org/>).
- Ensayos de indicador de luciferasa. Cada fragmento de 3'UTR de SGMS2 (nt 1656-1879 (sitio de unión) de NM_152621), UBA2 (nt 2527-2654 (sitio de unión) de NM_005499), DUSP11 (nt 1180-1572 (sitio de unión) de NM_003584), MAST4 (nt 8017-8096 (sitio de unión) de NM_001164664), SNX30 (nt 6659-7611 (sitio de unión) de NM_001012944) y CDS de ANXA2 (nt 244-743 (sitio de unión) de NM_001002857) se amplificó y clonó en los sitios XhoI y NotI de genes indicadores de luciferasa de luciérnaga y renilla de un vector psiCHECK-2 (Promega). Todos los productos de PCR clonados en el plásmido se verificaron mediante secuenciación de ADN para garantizar que estuvieran libres de mutaciones y en la dirección de clonación correcta. Las secuencias de los cebadores se enumeran en la Tabla 5. Para el ensayo de indicador de luciferasa, las células HOS se cotransfectaron con 100 ng de construcciones de luciferasa y moléculas miR-133a sintéticas 100 nM o control (oligonucleótido de ARNip no dirigido, Qiagen). Las actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla se midieron utilizando el ensayo de indicador de luciferasa doble (Promega) 48 h después de la transfección. Los resultados se expresaron como actividad de luciferasa de renilla relativa (luciferasa de renilla/luciferasa de luciérnaga).

Tabla 5. Secuencias de cebadores para ensayos de indicador de luciferasa

Gen	Dir/Inv	Secuencia (5'-Secuencia-3')	SEQ ID NO:
SGMS2-UTR	Dir	GCTCGAGTAAAGCAAAACAAAGGCATCAGC	82
	Inv	GCGGCCGCAAGGCTTGTCACCAATGAATGA	83
SGMS2mu-UTR	Dir	AAATGTCAACCATTTTGTGTAAACGATTA	84
	Inv	AAATGGTTGACATTTCTTCATTTACCAG	85
UBA2-UTR	Dir	GCTCGAGTAATACCGCCTGGTATGTCTGTG	86
	Inv	GCGGCCGCAATGCAGATGCCATTTATTTGGT	87
UBA2mu-UTR	Dir	TTATGTCAACCATAAATGGCATCTGCATT	88
	Inv	TTATGGTTGACATAAGTATAGTCGTTAT	89
SNX30-1-UTR	Dir	GCTCGAGTAACCCTGTTGGACAGGATTGAT	90
	Inv	GCGGCCGCAATTTTAAAGAAAGCATCTTTTATGG	91
SNX30mu-1-UTR	Dir	TCTTATCAACCCACTTCAGTCAGAAATGT	92
	Inv	AGTGGGTTGATAAGACTGCGAACAATCA	93
DUSP11-UTR	Dir	GCTCGAGTAAAAACCTGTCTGGAATTCTACC	94
	Inv	GCGGCCGCAAGATGGCCTTTGGGTCAATAA	95

(continuación)			
Gen	Dir/Inv	Secuencia (5'-Secuencia-3')	SEQ ID NO:
DUSP1Imu-UTR	Dir	CTGGATCAACGAGCTGGCCTGAAAATTAC	96
	Inv	GCTCGTTGATCCAGGTAGAATTCCAGGA	97
MAST4-UTR	Dir	GCTCGAGTAACTCCCCAGCTAGGAAACAG	98
	Inv	GCGGCCGCAAAGAGATGGGGCGGTCACT	99
MAST4mu-UTR	Dir	GACGTTCAACCGCCATCCCCAGCCCCAAA	100
	Inv	TGGCGTTGAACGTCTCTGCCACGTTT	101
ANXA2-UTR	Dir	GCTCGAGTAAGCGGGATGCTTTGAACATT	102
	Inv	GCGGCCGCAACTCCAGCGTCATAGAGATCC	103
ANXA2mu-UTR	Dir	ATCAATCAACCAGGTGTGGATGAGGTCAC	104
	Inv	ACCTGGTTGATTGATGGCTGTTTCAATG	105

Inmunohistoquímica. Para la tinción de CD133 y dianas de miR-133a, se prepararon portaobjetos de muestras clínicas de osteosarcoma y tumores xenoinjertados. La peroxidasa endógena se inhibió con H₂O₂ al 1 % (30 min). Los portaobjetos se calentaron para recuperar el antígeno en citrato de sodio 10 mM (pH 6,0). Posteriormente, los portaobjetos se incubaron con anticuerpos monoclonal de ratón anti-CD133/2 humano (1:1 Odilution, Miltenyi Biotec), monoclonal de ratón anti-SGMS2 humano (dilución 1:50, Abeam) o de control de isotipo coincidente durante una noche a 4 °C. Se realizó inmunodetección utilizando reactivos de detección de polímeros de peroxidasa ImmPRESS (Vector Laboratories) y el kit de sustrato DAB mejorado con metal (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. La tinción se reveló mediante contratinción con hematoxilina.

Análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS (SPSS, Inc.; Chicago, IL), con la excepción de la significación en gráficos de barras, en cuyo caso los análisis se realizaron aplicando la prueba de t de Student. Las diferencias en la expresión de CD133 entre los diferentes datos clinicopatológicos se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado (χ^2). Los casos con Δ Ct menor que el valor medio se clasificaron como con alta expresión de CD133, mientras que los casos con Δ Ct mayor que el valor medio se clasificaron como con baja expresión de CD133. El método de Kaplan-Meier y la prueba de rangos logarítmicos se utilizaron para comparar la supervivencia de los pacientes con tumores primarios CD133^{alto} y CD133^{bajo}. El periodo de supervivencia se definió como el tiempo desde el diagnóstico hasta la muerte, mientras que los pacientes vivos se censuraron en el momento de su último seguimiento. Para el cálculo de las diferencias en las expresiones de miR-133a y sus dianas, se aplicó el mismo procedimiento. En todos estos análisis, un valor de p de 0,05 o menos se consideró una diferencia significativa.

Ejemplo 1

Un pequeño subconjunto de células de la línea celular de osteosarcoma expresa CD133

Las líneas celulares de osteosarcoma SaOS2, HOS, U2OS, MNNG/HOS, MG63, 143B y Hu09 se examinaron para detectar marcadores de células madre mesenquimales o células madre neurales que se consideraron como el origen del sarcoma. Basu-Roy, U *et al.* (2011) Oncogene 31:2270-82; Kuhn, NZ *et al.* (2010) J. Cell. Physiol. 222:268-77. Como resultado, CD133, el homólogo estructural de prominina-1, se encontró en todas las líneas celulares en una población pequeña que variaba entre 0,04 % y 8,47 %, mientras que CD44 se encontró en una gran población (Fig. 1). Se encontró que SaOS2, MNNG/HOS y HOS eran particularmente fuertes en su expresión de CD 133 (8,47, 8,13 y 7,69 por ciento, respectivamente).

Se observó proliferación de células individuales de la población de células recién aisladas utilizando el colorante PKH, que es un colorante fluorescente que se une a las membranas celulares y se segrega en las células descendientes después de cada división celular. Normalmente, la concentración de PKH disminuye con cada división celular, de modo que las células inactivas permanecen PKH^{alto} y las células en división se vuelven progresivamente PKH^{bajo}. Por otra parte, normalmente, el colorante PKH67 se distribuye equitativamente entre las células descendientes, mientras que las células que se dividen rápidamente, por ejemplo, células cancerosas, muestran división asimétrica.

La población de células CD133^{alto} generó poblaciones tanto CD133^{alto} como CD133^{bajo} con diferentes destinos proliferativos: uno que es inactivo (PKH^{alto}) y otro que se divide activamente (PKH^{bajo}). Una sola célula PKH26^{alto} de fracción CD133^{alto} mostró división asimétrica; un pequeño número de células PKH26^{alto}, que se presentaban como células latentes, se observaron rodeadas de células PKH26^{bajo} el día 8, que se identificaron como una fracción con células tanto CD133^{alto} como CD133^{bajo} en el análisis de FACS. Por otro lado, una sola célula PKH67^{alto} de fracción SaOS2 CD133^{bajo} mostró una división simétrica; se observó una colonia con células PKH67^{bajo}, que se identificó como una fracción CD133^{bajo} en el análisis de FACS dos semanas después del aislamiento (Fig. 2). No se observó ninguna diferencia en la división celular según la expresión de CD44.

Se realizaron exámenes adicionales para identificar otros fenotipos de población CD133^{alto} y CD133^{bajo}. Se clasificaron un total de 5×10^3 células CD133^{alto} y CD133^{bajo} y se cultivaron inmediatamente en condiciones de entorno sin suero, independiente de anclaje complementado con factor de crecimiento. En las primeras dos semanas de cultivo, se observaron más esferas de osteosarcoma de células CD133^{alto} que de células CD133^{bajo} (Fig. 3).

Ejemplo 2

Las células CD133^{alto} muestran mayor resistencia a fármacos, invasividad y tumorigénesis

Ya que la resistencia a fármacos es una de las propiedades importantes de las TIC, se observaron poblaciones de células CD133^{alto} y CD133^{bajo} en la condición de tratamiento con doxorubicina (DOX), cisplatino (CDDP) y metotrexato (MTX), que son productos quimioterapéuticos convencionales contra el osteosarcoma. Las células CD133^{alto} fueron más resistentes a estos productos quimioterapéuticos que las células CD133^{bajo} (Fig. 4). Asimismo, las células CD133^{alto} mostraron mayor capacidad de invasión que las células CD133^{bajo} (Fig. 5). La qRT-PCR de ARNm de células recién aisladas CD133^{alto} y CD133^{bajo} reveló que las células SaOS2 CD133^{alto} expresaron niveles mejorados de *Oct3/4*, *Nanog* y *Sox-2*, que son factores de transcripción que desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de la autorrenovación y la pluripotencia de las células madre embrionarias, así como de las CSC o TIC (Levings, PP *et al.* (2009) Cancer Res. 69:5648-55; Basu-Roy U *et al.* (2011) Oncogene 31: 2270-82); genes transportadores de resistencia a múltiples fármacos *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2* y genes asociados a metástasis *integrina $\beta 4$* , *ezrina*, *MMP-13*, y *CXCR4* (Tang, N *et al.* (2008) Clin. Orthop. Relat. Res. 466:2114-30; Osaki, M *et al.* (2011) Mol. Ther. 19: 1123-30) (Fig. 6). Lo que es más importante, la fracción de HOS CD133^{alto} mostró tumorigenicidad más fuerte *in vivo* que la fracción de HOS CD133^{bajo}; las células CD133^{alto} pudieron formar tumores a partir de tan solo 100 células, mientras que las células CD133^{bajo} no pudieron (Fig. 7). Los resultados también se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Desarrollo tumoral *in vivo* utilizando solo poblaciones de osteosarcoma CD133^{alto} y CD133^{bajo}

Tipo celular	Incidencia del tumor	Número de células
CD133 ^{alto}	5/5	100.000
	5/5	10.000
	5/5	1.000
	4/5	100
CD133 ^{bajo}	4/5	100.000
	1/5	10.000
	1/5	1.000
	1/5	100

Ejemplo 3

La expresión de alto nivel del ARN mensajero de CD 133 es un marcador de bajas tasas de supervivencia de pacientes con osteosarcoma

Para evaluar la importancia clínica de CD133, se analizaron líneas celulares establecidas a partir de biopsias de osteosarcoma humano nuevas mediante un citómetro de flujo y se encontró que contenían una población CD133^{alto} a una frecuencia poco habitual <10 % (Fig. 8). Asimismo, un estudio clínico de 35 pacientes con osteosarcoma reveló que los altos niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) de CD133 se correlacionaron con tasas de supervivencia global significativamente peores de los pacientes con osteosarcoma (prueba de rangos logarítmicos, $P = 0,0262$). Los resultados se muestran en las Fig. 9 y la Tabla 7.

Tabla 7. Análisis univariantes y multivariantes y la relación entre las variables clinicopatológicas y la expresión de CD133 en 35 casos

Variable	Número de casos	CD133 Bajo	CD133 Alto	Correlación (CD133) χ^2 (valor de P)
Edad (años)				0,120
0-10	7	6	1	
11-20	25	11	14	
21 +	3	1	2	
Sexo				0,164
Hombre	23	14	9	
Mujer	12	4	8	
Sitio				0,319
Fémur	21	12	9	

(continuación)				
Variable	Número de casos	CD133 Bajo	CD133 Alto	Correlación (CD133) χ^2 (valor de P)
Tibia	9	5	4	0,394
Húmero	2	1	1	
Otros	3	0	3	
Histología				
Osteoblástico	16	9	7	0,045
Condroblástico	6	4	2	
Fibroblástico	2	0	2	
Otros, ND*	11	5	6	
Metástasis en el momento del diagnóstico				0,425
Presente	4	0	4	
Ausente	31	18	13	
Quimioterapia neoadyuvante				0,088
MTX+DOX/CDDP	21	10	11	
IFO+DOX/CDDP	13	8	5	
Otros	1	0	1	
Respuesta a la quimioterapia neoadyuvante				0,088
Buena (necrosis > 90 %)	11	6	5	
Mala (necrosis < 90 %)	20	12	8	
ND*	4	0	4	
Expresión de ARNm de CD133				0,088
Alta	17	0	17	
Baja	18	18	0	

Ejemplo 4

- 5 *miR-1, miR-10b y miR-133a están regulados positivamente en células CD133^{alto} en comparación con células CD133^{bajo}*

10 Se ha señalado que los perfiles de expresión de miARN son una herramienta de diagnóstico y pronóstico útil, y muchos estudios han indicado que determinados miARN actúan como un oncogén o un supresor tumoral. Croce, CM (2009) Nat. Rev. Genet. 10:704-10. Con el fin de caracterizar adicionalmente el mecanismo molecular subyacente a los fenotipos CD133^{alto} y CD133^{bajo}, se realizó el perfil de miARN de células SaOS2 y HOS aisladas de osteosarcoma CD133^{alto} y CD133^{bajo} utilizando análisis de micromatrices que contiene 866 miARN humanos validados por secuencia. Los resultados, mostrados en la Fig. 10 y en la Tabla 8, revelaron que 3 miARN estaban regulados positivamente con cambios >2 veces mayores en células CD133^{alto} en comparación con células CD133^{bajo}. Un segundo ciclo de estudio de validación de qPCR reveló que miR-1, miR-10b y miR-133a fueron coherentes con los datos de micromatrices (Fig. 11).

Tabla 8. Perfil de expresión de microARN de células de osteosarcoma CD133^{alto} frente a CD133^{bajo}

miARN	Factor de cambio (SaOS2 CD133 ^{alto} frente a CD133 ^{bajo})	Regulación	Factor de cambio (FOS CD133 ^{alto} frente a CD133 ^{bajo})	Regulación
miARN habitualmente regulados positivamente en SaOS2 y HOS con cambio >2 veces mayor en células CD133 ^{alto} en comparación con células CD133 ^{bajo}				
hsa-miR-1	7,23	positiva	3,81	positiva
hsa-miR-500*	5,39	positiva	3,99	positiva
hsa-miR-660	2,09	positiva	2,05	positiva
miARN regulados positivamente en SaOS2 con cambio >2 veces mayor en células CD133 ^{alto} en comparación con células CD133 ^{bajo}				
hsa-miR-551b	9,49	positiva		
hsa-miR-30e	9,19	positiva		

(continuación)

miARN	Factor de cambio (SaOS2 CD133 ^{alto} frente a CD133 ^{bajo})	Regulación	Factor de cambio (FIOS CD133 ^{alto} frente a CD133 ^{bajo})	Regulación
miARN regulados positivamente en SaOS2 con cambio >2 veces mayor en células CD133 ^{alto} en comparación con células CD133 ^{bajo}				
hsa-miR-148b	8,26	positiva		
hsa-miR-193a-3p	7,77	positiva		
hsa-miR-1	7,23	positiva		
hsa-miR-221*	6,76	positiva		
hsa-miR-24-1*	6,36	positiva		
hsa-miR-1825	5,78	positiva		
hsa-miR-500*	5,39	positiva		
hsa-miR-92a-2*	4,36	positiva		
hsa-miR-1202	3,39	positiva		
hsa-miR-424	3,23	positiva		
hsa-miR-19b-2*	2,87	positiva		
hsa-miR-29c	2,42	positiva		
hsa-miR-494	2,37	positiva		
hsa-miR-10b	2,16	positiva		
hsa-miR-374a	2,11	positiva		
hsa-miR-660	2,09	positiva		
hsa-miR-30e*	2,03	positiva		
miARN regulados positivamente en SaOS2 con cambio <2 veces mayor en células CD133 ^{alto} en comparación con células CD133 ^{bajo}				
hsa-miR-1281	9,45	negativa		
hsa-miR-195	6,56	negativa		
hsa-miR-129-5p	5,74	negativa		
hsa-miR-129-3p	4,98	negativa		
hsa-miR-183	4,89	negativa		
hsa-miR-1305	4,76	negativa		
hsa-miR-1275	4,65	negativa		
hsa-miR-484	4,55	negativa		
hsa-miR-1268	4,51	negativa		
hsa-miR-186	4,51	negativa		
hsa-miR-181a*	4,46	negativa		
hsa-miR-744*	2,72	negativa		
hsa-miR-96	2,65	negativa		
hsa-miR-142-3p	2,35	negativa		
hcmv-miR-US25-2-5p	2,31	negativa		
miARN regulados positivamente en HOS con cambio >2 veces mayor en células CD133 ^{alto} en comparación con células CD133 ^{bajo}				
hsa-miR-1181			12,78	positiva
hsa-miR-133b			7,22	positiva
hsa-miR-532-			7,10	positiva

(continuación)

miARN	Factor de cambio (SaOS2 CD133 ^{alto} frente a CD133 ^{bajo})	Regulación	Factor de cambio (FIOS CD133 ^{alto} frente a CD133 ^{bajo})	Regulación
5p				
hsa-miR-338-3p			6,30	positiva
hsa-miR-9			5,95	positiva
hsa-miR-34c-5p			5,37	positiva
hsa-miR-378*			5,26	positiva
hsa-miR-181a*			5,04	positiva
hsa-miR-145*			4,97	positiva
hsa-miR-1271			4,97	positiva
hsa-miR-362-3p			4,67	positiva
hsa-miR-152			4,63	positiva
hsa-miR-663			4,46	positiva
hsa-miR-9*			4,15	positiva
hsa-miR-340			4,10	positiva
hsa-miR-744			4,07	positiva
hsa-miR-500*			3,99	positiva
hsa-miR-1			3,81	positiva
hsa-miR-1305			3,33	positiva
hsa-miR-744*			3,11	positiva
hsa-miR-629			2,88	positiva
hsa-miR-629*			2,71	positiva
hsa-miR-145			2,55	positiva
hsa-miR-1246			2,47	positiva
hsa-miR-21*			2,39	positiva
hsa-miR-450a			2,35	positiva
hsa-miR-425*			2,31	positiva
hsa-miR-148a			2,30	positiva
hsa-let-7f-1*			2,26	positiva
hsa-miR-301b			2,21	positiva
hsa-miR-1826			2,15	positiva
hsa-miR-128			2,15	positiva
hsa-miR-378			2,14	positiva
hsa-miR-126			2,13	positiva
hsa-miR-598			2,06	positiva
hsa-miR-1915			2,05	positiva
hsa-miR-660			2,05	positiva
hsa-miR-933			2,02	positiva
miARN regulados positivamente en HOS con cambio <2 veces mayor en células CD133 ^{alto} en comparación con células CD133 ^{bajo}				
hsv1-miR-H6			4,60	negativa
hsa-miR-1539			4,02	negativa
hsa-miR-483-3p			3,76	negativa
hsa-miR-328			3,72	negativa
hsa-miR-132*			3,67	negativa
hsa-miR-129*			3,66	negativa
hsa-miR-548c-			3,13	negativa

(continuación)

miARN	Factor de cambio (SaOS2 CD133 ^{alto} frente a CD133 ^{bajo})	Regulación	Factor de cambio (FIOS CD133 ^{alto} frente a CD133 ^{bajo})	Regulación
5p				
hsa-miR-1825			2,05	negativa
hsa, <i>Homo sapiens</i> .				

miARN y miARN* son las dos cadenas del producto de ARN bicatenario de procesamiento por dicer del miARN precursor del tallo-bucle. miARN es la cadena "guía" que con el tiempo entra en RISC y miARN* es la otra cadena "pasajera". El nivel de miARN* presente en la célula es bajo ($\leq 15\%$ en relación con el miARN correspondiente). En los casos donde hay una mayor proporción de cadena pasajera presente en la célula, se usa la nomenclatura miARN-3p/miARN-5p en lugar de miARN/miARN*. miARN-3p es el miARN procedente de la rama 3' del miARN precursor y miARN-5p es el miARN procedente de la rama 5' del miARN precursor.

Ejemplo 5

La transfección de células CD133^{bajo} con miR-133 confiere propiedades asociadas con células CD133^{alto} y la alta expresión de miR-133a se correlaciona con un mal pronóstico clínico

Para determinar si estos miARN pueden inhibir estos fenotipos de células iniciadoras de tumores de osteosarcoma, los niveles de expresión de miR-1, miR-10b y miR-133a se manipularon en células CD133^{bajo} (Fig. 12). Estos miARN, especialmente miR-133a, potenciaron la invasividad de células CD133^{bajo} en comparación con los oligonucleótidos de miR-CN (control negativo) (Fig. 13). Resulta interesante que la transfección de todos estos miARN potenció drásticamente la invasión de células CD133^{bajo} (Fig. 13). La proliferación celular y la resistencia a fármacos se potenció ligeramente en células CD133^{bajo} mediante transfección de miR-133 (Fig. 14). Las células HOS CD133^{bajo} estables con sobreexpresión de miR-133a (Fig. 15) mostraron una capacidad más fuerte (> 2 veces) para formar esferas que las células CD133^{bajo} de control en un entorno sin suero de anclaje y pudieron desarrollar tumores con tan solo 100 células *in vivo* mientras que las células CD133^{bajo} de control no pudieron (Fig. 16 y Tabla 9).

Tabla 9. Desarrollo tumoral *in vivo* utilizando poblaciones CD133^{bajo} de osteosarcoma que sobreexpresan de forma estable miR-133a

Tipo celular	Incidencia del tumor	Número de células
miR-133a CD133 ^{bajo}	5/5	100.000
	4/4	10.000
	5/5	1.000
	2/5	100
VV ¹ CD133 ^{bajo}	5/5	100.000
	1/4	10.000
	0/5	1.000
	0/5	100
CDDP ² CD133 ^{bajo}	5/5	100
solución salina ³ CD133 ^{bajo}	0/5	100

¹ VV, vector vacío.

² CDDP, células tratadas con CDDP.

³ Solución salina, células tratadas con solución salina.

La transfección de miR-133a también aumentó los niveles de ARN mensajero (ARNm) de las moléculas que estaban reguladas positivamente en células CD 133^{alto} (véase Fig. 6) pero no ARNm de CD 133, lo que sugiere que miR-133a no afecta la expresión de las moléculas en la ruta corriente arriba de CD133 (Fig. 17). Estos resultados revelaron que miR-133a es un miARN candidato que puede regular los fenotipos de TIC de osteosarcoma. De hecho, la expresión de miR-133a también fue alta en la fracción de CD133^{alto} de biopsias de osteosarcoma (Fig. 18), y la alta expresión de miR-133a se correlacionó significativamente con el mal pronóstico de los pacientes (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis univariantes y multivariantes y la relación entre las variables clinicopatológicas y la expresión de miR-133a en 48 casos

Variable	Número de casos	miR-133a Bajo	miR-133a Alto	Correlación (CD133)x ² (valor de p)
Edad (años)				0,228
0-10	9	9	0	
11-20	30	23	7	
21 +	9	8	1	
Sexo				1,000
Hombre	31	26	5	
Mujer	17	14	3	
Sitio				0,566
Fémur	26	22	4	
Tibia	16	14	2	
Húmero	2	1	1	
Otros	4	3	1	
Histología				0,142
Osteoblástico	25	23	2	
Condroblástico	7	6	1	
Fibroblástico	2	2	0	
Otros, ND*	14	9	5	
Metástasis en el momento del diagnóstico				0,330
Presente	7	5	2	
Ausente	41	35	6	
Quimioterapia neoadyuvante				0,902
MTX+DOX/CDDP	29	24	5	
IFO+DOX/CDDP	18	15	3	
Otros	1	1	0	
Respuesta a la quimioterapia neoadyuvante				0,173
Buena (necrosis > 90 %)	17	16	1	
Mala (necrosis < 90 %)	26	21	5	
ND*	5	3	2	
Expresión de miR-133a				
Alta	8	0	8	
Baja	40	40	0	

Ejemplo 6

5

La transfección de células SaOS2 CD133^{bajo} con miARN da como resultado aumento de la proliferación.

Se aislaron células SaOS2 CD133^{bajo} por clasificación celular y después se transfectaron con ARN de control negativo (CN), miR-1 solo, miR-10b solo, miR-133a solo, miR-1 más miR-10b, miR-10b más miR-133a, miR-1 más miR-133a o miR-1 más miR-1 Ob más miR-133a. También se aislaron células CD133^{alto} por clasificación celular y después se transfectaron con ARN de control negativo (CN). Cada población de células se mantuvo por separado en cultivo tisular durante 3-7 días y después se estudió con un microscopio óptico para evaluar la proliferación celular. Los resultados se muestran en la Fig. 19. Como resulta evidente a partir de la Fig. 19, células SaOS2 CD133^{bajas} transfectadas con miR-1 solo, miR-10b solo, miR-133a solo, miR-1 más miR-10b, miR-10b más miR-133a, miR-1 más miR-133a o miR-1 más miR-1 Ob más miR-133a proliferaron en mayor medida que las células SaOS2 CD133^{bajo} transfectadas con ARN de control negativo. Las células SaOS2 CD133^{bajo} transfectadas con miR-1 más miR-1 Ob más miR-133a proliferaron casi en la misma medida que las células CD133^{alto} transfectadas con ARN de control negativo. Los efectos de las combinaciones fueron al menos aditivos.

Se obtuvieron resultados similares en un experimento con células MNNG/HOS en lugar de células SaOS2 (Fig. 20).

Ejemplo 7

La transfección de células SaOS2 CD133^{bajo} con miARN da como resultado resistencia a fármacos

Se aislaron células SaOS2 CD133^{bajo} por clasificación celular y después se transfectaron con ARN de control negativo (CN), miR-1 solo, miR-10b solo, miR-133a solo o miR-1 más miR-10b más miR-133a, similar al Ejemplo 1. Cada población de células transfectadas se mantuvo después por separado en cultivo tisular durante cuatro días en presencia de doxorubicina 30 nM, cisplatino 2,5 µM o metotrexato 320 nM, y después se contaron las células. Los resultados se muestran en la Fig. 21. Como resulta evidente a partir de la Fig. 21, las células SaOS2 CD133^{bajo} transfectadas con miR-133a solo o con miR-1 más miR-10b más miR-133a proliferaron en mayor medida que el control negativo en presencia de cisplatino y en presencia de metotrexato. La adición de miR-133a se asoció por tanto con mayor resistencia al cisplatino y metotrexato.

Ejemplo 8

miR-1, miR-10b y miR-133a son inducidos por tratamiento con cisplatino

Las expresiones de miR-1, miR-10b y miR-133a, así como CD133, fueron inducidas por tratamiento con cisplatino. El análisis de qRT-PCR mostró que las células 143B tratadas con DOX o tratadas con CDDP (3 días) expresaban un mayor nivel de miR-1, miR-10b y miR-133a en relación con las células 143B no tratadas (Fig. 22). Además, la expresión de miR-133a se potenció mediante cisplatino en células HOS CD133^{bajo}. Asimismo, la exposición a CDDP aumentó la tumorigenicidad *in vivo* de población de HOS CD133^{bajo}. Las células HOS CD133^{bajo} tratadas con CDDP pudieron formar tumores con tan solo 100 células por inyección, mientras que las células HOS CD133^{bajo} no tratadas no pudieron (Fig. 23 y Tabla 9). Estos datos indican que los fenotipos de TIC, así como la expresión de ARNm de CD133 y miR-133a, podrían ser potenciados por productos quimioterapéuticos. Por lo tanto, los inventores razonaron que el silenciamiento de miR-133a antes o durante la quimioterapia evitaría el aumento de la expresión de miR-133a, lo que potenciaba los fenotipos de TIC y fue inducido por productos quimioterapéuticos.

Ejemplo 9

El antisentido para miR-133a reduce la proliferación de células CD133^hβ^h

Para evaluar si el silenciamiento de miR-133a puede suprimir los fenotipos malignos de osteosarcoma, se realizaron experimentos opuestos a los del Ejemplo 8 mediante la introducción de ácido nucleico bloqueado (LNA) anti-miR-133a. El LNA es una clase de análogos de ácido nucleico que poseen afinidad muy alta y excelente especificidad hacia ADN y ARN complementarios, y los oligonucleótidos de LNA se han aplicado como moléculas antisentido tanto *in vitro* como *in vivo*. Elmen, J *et al.* (2008) Nature 452:896-9; Obad, S *et al.* (2011) Nat. Genet. 43:371-8. Se aisló una población CD133^{alto} de células SaOS2 y HOS mediante clasificación celular y se transfectó con LNA-anti-miR-133a (LNA-133a) y LNA-control negativo (LNA-CN). Como control, las células SaOS2 y HOS CD133^{bajo} aisladas también se transfectaron con LNA-CN. La eficacia de LNA-133a para el silenciamiento de miR-133a se confirmó mediante análisis de RT-PCR en tiempo real (Fig. 24). Las células SaOS2 y HOS CD133^{alto} transfectadas con LNA-133a tuvieron supresión de la tasa de proliferación hasta el mismo nivel de células CD133^{bajo} transfectadas con LNA-CN (Fig. 25).

Ejemplo 10

Las células CD133^{alto} transducidas con LNA-133a muestran sensibilidad a fármacos potenciada e invasividad reducida

Las células CD133^{alto} transducidas con LNA-133a mostraron una sensibilidad potenciada a DOX y CDDP en el nivel de células CD133^{bajo} transducidas con LNA-CN. Estos resultados se validaron contando células teñidas con Hoechst que mostraban condensación nuclear apoptótica y fragmentación en células CD133^{alto}. Hubo una tasa significativamente mayor de muerte celular apoptótica en células CD133^{alto} transducidas con LNA-133a en comparación con las células CD133^{alto} de control (Fig. 26). Asimismo, LNA-133a redujo la capacidad de invasión de las poblaciones de SaOS2 y HOS CD133^{alto} (Fig. 27) y la expresión de las moléculas asociadas con fenotipos CD133^{alto} (Fig. 28). En conjunto, estas observaciones sugieren que el silenciamiento de células miR-133a CD133^{alto} puede reducir el fenotipo maligno de TIC de osteosarcoma, incluyendo resistencia a fármacos e invasión.

Ejemplo 11

El silenciamiento de miR-133a in vivo es eficaz para el tratamiento del osteosarcoma y muestra eficacia sinérgica en combinación con CDDP

Para extender los hallazgos *in vitro* y determinar si el silenciamiento de miR-133a podría ser una opción terapéutica eficaz para el tratamiento del osteosarcoma, se examinó el efecto de LNA-133a en un modelo de metástasis pulmonar espontánea de osteosarcoma. Experimentalmente, se implantaron 1,5 x 10⁶ células de 143B transfectadas con gen de luciferasa de luciérnaga (143B-*luc*) ortotópicamente en la tibia proximal derecha de ratones desnudos atímicos. El crecimiento de tumor implantado y la presencia de metástasis distantes se analizaron semanalmente para determinar la bioluminiscencia de luciferasa utilizando un sistema de captura de imágenes *in vivo* (IVIS). Se realizó un nuevo protocolo de tratamiento de administración intravenosa (i.v.) de LNA-133a (10 mg kg⁻¹) 24 h antes

de la inyección intraperitoneal (i.p.) de CDDP (2,5 mg kg⁻¹) (Fig. 29) para reducir la resistencia a fármacos y para prevenir la inducción de fenotipos de TIC por quimioterapia, que se observaron en experimentos *in vitro*. Antes del estudio animal de este protocolo, los inventores confirmaron niveles reducidos de miR-133a en tejidos de osteosarcoma de ratones tratados con LNA-133a en comparación con los de ratones tratados con solución salina (Fig. 30). Para evaluar la eficacia del nuevo protocolo de tratamiento, los resultados se compararon con tres grupos de control ($n = 10$ cada uno): un grupo de control salino, un grupo de LNA y un grupo de CDDP. A las 5 semanas, la mitad de los ratones de cada grupo se sacrificaron para un análisis adicional; los ratones restantes se supervisaron para determinar la supervivencia.

Resultados. La expresión de miR-133a de los tumores se redujo en presencia de LNA-133a (Fig. 31). Los ratones a los que se administró LNA-133a (10 mg kg⁻¹ i.v.) y CDDP (2 mg kg⁻¹ i.p.) mostraron un crecimiento tumoral significativamente menor en comparación con los otros grupos (Fig. 32 y 33). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento tumoral en presencia o en ausencia de CDDP solo (Figs. 32 y 33). Asimismo, se observó metástasis pulmonar en 10/10 (100 %) del grupo de solución salina, 7/10 (70 %) del grupo de LNA, 8/10 (80 %) del grupo de CDDP y solo 3/10 (30 %) del grupo de combinación (LNA-133a + CDDP) el día 35 (Tabla 11).

Tabla 11. Resultado del tratamiento con LNA en ratones portadores de osteosarcoma

Grupo	Peso del tumor (media) (g)	Metástasis pulmonar	Luminiscencia del pulmón (media)
Ctrl.	3,928	10/10	5047
LNA	3,143	7/10	1744
CDDP	3,957	8/10	2855
LNA + CDDP	1,901	3/10	582

La luminiscencia promedio en la región del tórax se redujo significativamente en ratones tratados con la combinación de LNA-133a y CDDP. Tanto el número como el tamaño de la metástasis pulmonar en cada lóbulo se validaron en el ensayo de luciferasa y en el examen histopatológico.

De forma destacable, se encontró que el efecto de la terapia de combinación (LNA-133a + CDDP) mostraba inhibición sinérgica de la metástasis pulmonar.

Asimismo, la terapia de combinación (LNA-133a + CDDP) extendió significativamente el periodo de supervivencia de los ratones portadores de tumores (prueba de rangos logarítmicos, $P = 0,0084$, Fig. 34). A pesar de la secuencia altamente conservada de miR-133a humano maduro y miR-133a murino (por ejemplo, N.º de referencia de GenBank NR_029676; 5'-UUUGGUCCCCUUAACACAGCUG-3'; SEQ ID NO: 3), todos los ratones mostraron efectos tóxicos mínimos en diversos tejidos, incluyendo corazón, hígado y músculo esquelético durante el periodo de observación. Por tanto, la administración sistémica de LNA-133a es eficaz para la supresión del crecimiento tumoral y la metástasis pulmonar en el modelo de xenoinjerto para osteosarcoma muy metastásico en presencia de cisplatino.

Ejemplo 12

Identificación de dianas génicas para miR-133a

Los ejemplos anteriores establecen que miR-133a regula la neoplasia maligna de TIC de osteosarcoma CD133^{alto} y la inhibición de la expresión de miR-133a en células de osteosarcoma inhibe el desarrollo del tumor. Con el fin de entender los mecanismos regulados por miR-133a en TIC de osteosarcoma CD133^{alto}, el perfil de expresión de ARNm candidato se realizó mediante dos análisis de micromatrices diferentes junto con predicciones por ordenador (Fig. 35). Los inventores detectaron 1812 genes regulados negativamente con al menos una reducción de 1,2 veces en el primer análisis de micromatrices de ARN total recogido de células SaOS2 CD133^{bajo} transducidas con miR-133a o CN, mientras que se detectaron 4976 genes regulados positivamente con al menos un aumento de 2,0 veces en el segundo análisis de micromatrices de la expresión de ARNm en ARN recogido de inmunoprecipitación de anticuerpo anti-Ago2 en células CD133^{bajo} transducidas con miR-133a o CN (Fig. 36). Posteriormente, se recogieron 226 genes por ambos métodos (Tabla 12), y se identificaron 20 genes en TargetScanHuman 6.0, una de las bases de datos informáticas públicamente disponibles (Fig. 36).

Tabla 12. Dianas génicas predichas para miR-133a mediante dos análisis de micromatriz de ADNc y predicción por ordenador

Símbolo génico	Referencia de GenBank	Nombre del gen	Factor de aumento, complejo miR-133a-Ago2	Factor de reducción, transfección de miR-133a
PGAP1	NM_024989	Unión post-GPI a proteínas 1	7,60	-0,42
C1orf118	XR_041258	fase abierta de lectura 118 del cromosoma 1	7,19	-0,28
DYNLT3	NM_006520	dineína, cadena ligera, tipo Tetex 3	7,17	-0,42
AGFG1	NM_001135187	ArfGAP con repeticiones FG 1	6,69	-0,28
WDR44	NM_019045	Dominio repetido WD 44	6,36	-0,43
FLYWCH1	NM_020912	Dedo de cinc tipo FLYWCH 1	5,62	-0,32
CARKD	NM_018210	dominio de carbohidrato quinasa que contiene	5,50	-0,66
CUL4B	NM_003588	culina 4B	5,30	-0,40
ETS1	NM_005238	homólogo 1 del oncogén E26 del virus de la eritroblastosis v-ets (aviar)	5,29	-0,74
HDAC6	NM_006044	histona desacetilasa 6	5,20	-0,36
C19orf10	NM_019107	fase abierta de lectura 10 del cromosoma 19	5,17	-0,36
RASA2	NM_006506	activador 2 de proteína RAS p21	5,15	-0,44
KIAA1958	NM_133465	KIAA1958	5,14	-0,28
LOC645851	NR_024395	LOC645851 hipotético	5,09	-0,37
TBPL1	NM_004865	tipo TBP 1	4,86	-0,33
SNX26	NM_052948	nexina de clasificación 26	4,73	-0,27
SCRN1	NM_001145513	secemina 1	4,72	-0,55
LOC100132672	XR_038504	similar a la 3 que contiene dominio de glucosiltransferasa 8	4,61	-0,36
AP4S1	NM_001128126	complejo proteico relacionado con el adaptador 4, subunidad sigma 1	4,39	-0,59
SF3B3	NM_012426	factor de corte y empalme 3b, subunidad 3, 130 kDa	4,34	-0,27
LMBR1	NM_022458	homólogo de la región de extremidad 1 (ratón)	4,31	-0,40
HERC4	NM_022079	dominio hect y RLD 4	4,26	-0,69
ADAMTS1	NM_006988	Metalopeptidasa ADAM con motivo trombospondina de tipo 1, 1	4,17	-0,47
CYB5R4	NM_016230	citocromo b5 reductasa 4	4,14	-0,29
LHFPL2	NM_005779	tipo compañero de fusión de HMGIC de lipoma 2	4,11	-0,30
FAM13A0S	NR_002806	cadena opuesta de FAM13A (no codificante proteínas)	4,04	-0,28
RALGAPA1	NM_194301	proteína activadora de Ral GTPasa, subunidad alfa 1 (catalítica)	4,00	-0,53
TNFRSF13C	NM_052945	superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 13C	3,99	-0,44
LOC100131829	AK124002	proteína hipotética LOC100131829	3,95	-0,43
Clorf58	NM_144695	fase abierta de lectura 58 del cromosoma 1	3,92	-0,54
TNFRSF10D	NM_003840	superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 10d, señuelo con dominio de muerte truncado	3,75	-0,45
ZDHHC17	NM_015336	dedo de cinc, que contiene tipo DFIFIC 17	3,68	-0,36

(continuación)

Símbolo génico	Referencia de GenBank	Nombre del gen	Factor de aumento, complejo miR-133a-Ago2	Factor de reducción, transfección de miR-133a
LOC729603	NR_003288	pseudogén de proteína de unión a calcio P22	3,62	-0,34
SNX30	NM_001012994	miembro de la familia de nexina de clasificación 30	3,55	-0,41
TSTD2	NM_139246	que contiene dominio de tipo tiosulfato sulfurtransferasa (rodaneso) 2	3,52	-0,38
SPRYD4	NM_207344	que contiene dominio SPRY 4	3,51	-0,35
PTPMT1	NM_175732	proteína tirosina fosfatasa, mitocondrial 1	3,50	-0,38
KLHDC4	NM_017566	que contiene dominio kelch 4	3,43	-0,43
SLC30A7	NM_133496	familia de transportador de soluto 30 (transportador de cinc), miembro 7	3,38	-0,48
TCEA3	NM_003196	factor de elongación de la transcripción A (SI I), 3	3,32	-0,39
GORASP1	NM_031899	proteína de apilación de reensamblaje del golgi 1, 65 kDa	3,17	-0,51
RBM15B	NM_013286	proteína de motivo de unión a ARN 15B	3,13	-0,80
PDGFRB	NM_002609	receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido	3,13	-0,37
ITPRIPL2	NM_001034841	tipo proteína de interacción con el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato 2	3,09	-0,34
FBX03	NM_033406	proteína de caja F 3	3,01	-0,35
FAM122B	NM_001166600	familia con similitud de secuencia 122B	3,00	-0,30
MINPP1	NM_004897	inositol polifosfato fosfatasa múltiple, 1	2,98	-0,28
SPOPL	NM_001001664	tipo proteína de tipo speckle POZ	2,94	-0,47
FAM86B1	NM_001083537	familia con similitud de secuencia 86, miembro B1	2,85	-0,44
LOC100128071	XM_001724939	similar a hCG41624	2,83	-0,31
CCNT1	NM_001240	ciclina T1	2,82	-0,53
AP2M1	NM_004068	complejo proteico relacionado con el adaptador. 2, subunidad mu 1	2,80	-0,44
AKIRIN1	NM_024595	akirina 1	2,73	-0,27
CHMP5	NM_016410	proteína modificadora de cromatina 5	2,69	-0,61
PPM1K	NM_152542	proteína fosfatasa 1K (que contiene el dominio PP2C)	2,67	-0,53
MICALL2	NM_182924	tipo MICAL 2	2,66	-0,29
DGKZ	AK123378	diacilglicerol quinasa, zeta 104 kDa	2,65	-0,39
SCARNA16	NR_003013	ARN específico de cuerpos de Cajal pequeño 16	2,65	-0,50
SERPINE1	NM_000602	inhibidor de serpina peptidasa, clado E (nexina, inhibidor del activador de plasminógeno de tipo 1), miembro 1	2,65	-0,61
STARD13	NM_178006	que contiene dominio de transferencia de lípidos relacionado con STAR (START) 13	2,58	-0,28
R0D1	NM_005156	ROD1 regulador de la diferenciación 1 (<i>S. pombe</i>)	2,55	-0,36
VEGFC	NM_005429	factor de crecimiento endotelial vascular C	2,45	-0,35
MYH9	NM_002473	miosina, cadena pesada 9, no muscular	2,43	-0,39
CCNJ	NM_019084	ciclina J	2,41	-0,26

(continuación)

Símbolo génico	Referencia de GenBank	Nombre del gen	Factor de aumento, complejo miR-133a-Ago2	Factor de reducción, transfección de miR-133a
WDR66	NM_144668	Dominio repetido WD 66	2,38	-0,32
CSRNP1	NM_033027	proteína nuclear rica en cisteína-serina 1	2,34	-0,28
MYBL1	NM_001144755	tipo homólogo del oncogén vírico de la mieloblastosis v-myb (aviar) 1	2,32	-0,29
EME2	BC041011	homólogo 2 de endonucleasa meiótica esencial 1 (<i>S. pombe</i>)	2,31	-0,44
MGC27382	AK091757	MGC27382 hipotético	2,27	-0,33
MMP14	NM_004995	metaloendopeptidasa de la matriz 14 (insertada en la membrana)	2,27	-0,42
WASH1	NM_182905	homólogo de la familia de proteína WAS 1	2,26	-0,32
RIMS2	NM_014677	reguladora de la exocitosis de la membrana sináptica 2	2,25	-0,45
HSPG2	NM_005529	proteoglicano de heparán sulfato 2	2,25	-0,45
HDAC8	NM_018486	histona desacetilasa 8	2,21	-0,34
AK2	NM_013411	adenilato quinasa 2	2,20	-0,30
SRRM2	NM_016333	matriz con repeticiones de serina/arginina 2	2,19	-0,28
LOC731419	XM_001132610	proteína hipotética LOC731419	2,19	-0,32
SYNGR3	NM_004209	sinaptogirina 3	2,11	-0,33
PRUNE2	NM_015225	homólogo de prune 2 (<i>Drosophila</i>)	2,11	-0,38
MLKL	NM_152649	tipo de dominio de quinasa de linaje mixto	2,10	-0,30
DST	NM_001723	distonina	2,10	-0,44
PBXIP1	NM_020524	proteína que interacciona con caja homeótica de leucemia de pre-linfocitos B 1	2,03	-0,78
ANTXR2	NM_058172	receptor de toxina de carbunco 2	1,98	-0,61
NSF	NM_006178	factor sensible a N-etilmaleimida	1,98	-0,32
APH1A	NM_001077628	homólogo A de defectuoso en faringe anterior 1 (<i>C. elegans</i>)	1,98	-0,34
RASA1	NM_002890	activador de la proteína RAS p21 (proteína activadora de GTPasa) 1	1,95	-0,46
BAIAP2	NM_017451	proteína 2 asociada a BAI1	1,91	-0,29
GARNL3	NM_032293	tipo dominio Rap/RanGAP activador de GTPasa 3	1,90	-0,49
CKLF	NM_016951	factor de tipo quimiocina	1,89	-0,38
SNORD17	NR_003045	ARN nucleolar pequeño, caja C/D 17	1,88	-0,27
TRIT1	NM_017646	ARNt isopenteniltransferasa 1	1,88	-0,43
FILIP1L	NM_182909	tipo proteína que interacciona con filamina A 1	1,88	-0,36
VAMP2	NM_014232	proteína de membrana asociada a la vesícula 2 (sinaptobrevina 2)	1,87	-0,31
TBL1X	NM_005647	tipo transducina (beta) ligada a 1X	1,87	-0,30
LOC729314	XR_037423	similar a la proteína 1 de tipo POM121	1,85	-0,63
RHD	NM_016124	grupo sanguíneo Rh, antígeno D	1,84	-0,28
HERC2	NM_004667	dominio hect y RLD 2	1,81	-0,36
KIAA1967	NM_021174	KIAA1967	1,78	-0,32
YIPF2	NM_024029	familia del dominio Yip1, miembro 2	1,71	-0,48
MLL5	NM_182931	leucemia de linaje mielóide/linfoide o	1,71	-0,41

(continuación)

Símbolo génico	Referencia de GenBank	Nombre del gen	Factor de aumento, complejo miR-133a-Ago2	Factor de reducción, transfección de miR-133a
		mixto 5 (homólogo de trithorax, <i>Drosophila</i>)		
DUSP11	NM_003584	fosfatasa 11 de especificidad doble (que interacciona con el complejo 1 de ARN/RNP)	1,70	-0,28
ABL2	NM_001100108	homólogo de oncogén vírico de leucemia murina de Abelson v-abl 2 (arg, gen relacionado con Abelson)	1,68	-0,30
RBMX2	NM_016024	proteína de motivo de unión a ARN, ligado a X 2	1,65	-0,37
ALS2CR8	NM_024744	región cromosómica de esclerosis lateral amiotrófica 2 (juvenil), candidato 8	1,65	-0,30
EDH1	NM_005896	isocitrato deshidrogenasa 1 (NADP+), soluble	1,65	-0,31
NT5C3L	NM_052935	5'-nucleotidasa, tipo citosólico III	1,63	-0,40
ERMP1	NM_024896	metalo peptidasa de retículo endoplásmico	1,59	-0,86
GPSM1	NM_015597	modulador de señalización de proteína G 1 (tipo AGS3, <i>C. elegans</i>)	1,53	-0,47
ARHGEF10L	NM_018125	tipo factor de intercambio de nucleótidos de guanina de Rho (GEF) 10	1,52	-0,32
MFN2	NM_014874	mitofusina 2	1,52	-0,32
CG030	NR_026928	CG030 hipotético	1,49	-0,30
UBXN7	NM_015562	proteína de dominio UBX 7	1,49	-0,35
CCDC45	NM_138363	que contiene dominio superenrollado 45	1,47	-0,39
ZNF701	NM_018260	proteína de dedo de cinc 701	1,46	-0,68
LOC642406	AK024257	similar a tipo proteína asociada a contactina 3B	1,46	-1,34
PHF8	NM_015107	proteína de dedo de PFID 8	1,44	-0,28
MED23	NM_015979	subunidad de complejo mediador 23	1,42	-0,29
ARHGAP11B	NM_001039841	proteína activadora de GTPasa Rho 11B	1,42	-0,29
MYST4	NM_012330	MYST histona acetiltransferasa (leucemia monocítica) 4	1,41	-0,31
SYT17	NM_016524	sinaptotagmina XVII	1,40	-0,39
DPM2	NM_003863	polipéptido de doliquil-fosfato manosiltransferasa 2, subunidad reguladora	1,30	-0,35
TUB	NM_003320	homólogo de tubby (ratón)	1,30	-0,27
TBPL1	NM_004865	tipo TBP 1	1,30	-0,28
FAM40B	NM_020704	familia con similitud de secuencia 40, miembro B	1,30	-0,62
D0LPP1	NM_020438	doliquil pirofosfato fosfatasa 1	1,29	-0,34
HIST1H2BM	NM_003521	grupo de histonas 1, H2bm	1,29	-0,35
ZBTB7A	NM_015898	que contiene dedo de cinc y dominio BTB	1,28	-0,28
SLC30A7	NM_133496	familia de transportador de soluto 30 (transportador de cinc), miembro 7	1,25	-0,36
HCRT1	NM_001525	receptor 1 de hipocretina (orexina)	1,22	-0,27
DNAJB6	NM_005494	homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 6	1,22	-0,56
QPRT	NM_014298	quinolinato fosforribosiltransferasa	1,20	-0,32

(continuación)

Símbolo génico	Referencia de GenBank	Nombre del gen	Factor de aumento, complejo miR-133a-Ago2	Factor de reducción, transfección de miR-133a
CCDC75	NM_174931	que contiene dominio superenrollado 75	1,20	-0,29
NPTXR	NM_014293	receptor de pentraxina neuronal	1,19	-0,63
RHOB	NM_004040	familia del gen homólogo de ras, miembro B	1,19	-0,48
CDH7	NM_004361	cadherina 7, tipo 2	1,17	-0,34
COL5A1	AK057231	colágeno, tipo V, alfa 1	1,17	-0,50
SGMS2	NM_152621	esfingomielina sintasa 2	1,16	-0,32
LOC643802	XM_001716860	similar a la fosfoproteína 10 de fase M (ribonucleoproteína nucleolar pequeña U3)	1,15	-0,53
BCL11A	NM_018014	LLC de linfocitos B/linfoma 11A (proteína de dedos de cinc)	1,14	-0,28
GEN1	NM_182625	homólogo de Gen 1, endonucleasa (<i>Drosophila</i>)	1,14	-0,28
ZP1	NM_207341	glucoproteína 1 de la zona pelúcida (receptor de espermatozoide)	1,12	-0,30
EFTUD1	NM_024580	factor de elongamiento Tu que contiene unión a GTP 1	1,12	-0,47
REEP6	NM_138393	proteína accesoria de receptor 6	1,10	-0,58
UBA2	NM_005499	enzima activadora de modificador de tipo ubiquitina 2	1,08	-0,38
BRIP1	NM_032043	proteína de interacción con BRCA1 C-terminal 1	1,06	-0,27
KPTN	NM_007059	kaptina (proteína de unión a actina)	1,06	-0,57
DZIP1	NM_014934	proteína de interacción con DAZ 1	1,04	-0,35
MGC16275	NR_026914	proteína hipotética MGC16275	1,04	-0,29
APTX	NM_017692	aprataxina	1,03	-0,29
P2RX4	NM_002560	receptor purinérgico P2X, canal iónico activado por ligando, 4	1,02	-0,29
PCDH24	NM_017675	protocadherina 24	1,00	-0,37

En general, se seleccionaron diez candidatos potenciales para genes diana de miR-133a con estos datos combinados. A continuación, la expresión de estas moléculas se redujo utilizando el sistema de atenuación de genes inducido por ARNip para investigar si estos candidatos son dianas funcionalmente importantes de miR-133a en células de osteosarcoma. Como resultado, la atenuación de cuatro candidatos (*ANXA2*, *DUSP11*, *MAST4* y *ROD1*) en células SaOS2 CD133^{bajo} potenció la resistencia a fármacos (Fig. 37), y la atenuación de cinco candidatos (*ANXA2*, *DUSP11*, *SGMS2*, *SNX30* y *UBA2*) potenció la invasividad de células SaOS2 CD133^{bajo} (Fig. 38).

Por supuesto, el efecto de la atenuación de estos genes diana potenciales sería similar al efecto ejercido por miR-133a en estos mismos genes, dando como resultado mayor resistencia al fármaco y mayor invasividad de células SaOS2 CD133^{bajo}. Por el contrario, se esperaría que el silenciamiento de miR-133a en células SaOS2 CD133^{bajo} fuera permisivo para la expresión de los genes diana potenciales, de este modo reduciendo la resistencia a fármacos y reduciendo la invasividad de células SaOS2 CD133^{bajo}.

Para validar si estas moléculas están reguladas por miR-133a, el fragmento de 3'UTR (región no traducida) que contiene sitios de unión a miR-133a potenciales se clonó cadena abajo de una secuencia codificante de luciferasa y el indicador de luciferasa y los oligonucleótidos de miR-133a se cotransfectaron en células SaOS2. Como control, el indicador de luciferasa y los oligonucleótidos NO se cotransfectaron en células SaOS2. Las actividades de luciferasa se redujeron en aproximadamente 39-73 % en las células cotransfectadas con miR-133a en comparación con las células cotransfectadas con los oligonucleótidos CN (Fig. 39). A partir de los resultados de este ensayo, se encontró que *ANXA2*, *DUSP11*, *MAST4*, *SGMS2*, *SNX30* y *UBA2* actúan como dianas directas de miR-133a.

De hecho, se ha sugerido previamente que estos genes diana o genes de su familia actúan como supresores tumorales en otros cánceres determinados. Gostissa, M *et al.* (1999) EMBO J. 18:6462-71; Caprara, G *et al.* (2009) J. Cell. Mol. Med. 13:2158-70; Nguyen, LN *et al.* (2006) Clin. Cancer Res. 12:6952-9. Se ha indicado que *ANXA2*

está asociado con la función supresora de tumores en el osteosarcoma (Gillette, JM (2004) J. Cell Biochem. 92: 820-32), mientras que *MAST4* ha sido desconocido en biología tumoral (Garland, P (2008) Brain Res. 21:12-19).

De hecho, como se desvela en la presente invención, la expresión de todas estas dianas se incrementó mediante el silenciamiento de miR-133a en células CD133^{alto} (Fig. 40) y se redujo mediante la regulación positiva de miR-133a en células CD133^{bajo} (Fig. 41), de forma coherente con las correlaciones inversas observadas con la expresión de CD133 y miR-133a tanto en tumores xenoinjertados (Fig. 42) como en muestras clínicas (resultados no mostrados). El aumento de la expresión de las dianas mediante el silenciamiento de miR-133a se confirmó mediante qRT-PCR (resultados no mostrados) e inmunohistoquímica de tumores tratados con LNA (resultados no mostrados). Finalmente, al investigar las relaciones entre la expresión de estas dianas y el pronóstico del paciente con osteosarcoma, se encontró una correlación sorprendentemente cercana entre la expresión de ARNm de las dianas de miR-133a y el pronóstico del paciente (Fig. 43). Los pacientes con mayores niveles de expresión de estas dianas sobrevivieron mucho más tiempo que los pacientes con menor expresión, lo que indica que estas dianas podrían actuar como nuevos supresores tumorales en el osteosarcoma.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> 3-D Matrix, Ltd.

Instituto de Investigación del Centro Nacional del Cáncer (Japón)

<120> MÉTODOS Y ENSAYOS BASADOS EN MICROARN PARA EL OSTEOSARCOMA

<130> TDX-004.25

<150> US 61/531.942

<151> 07/09/2011

<150> US 61/696.981

<151> 05/09/2012

<160> 105

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

uggaauguaa agaaguaugu au 22

<210> 2

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2

uaccuguag aaccgaauu gug 23

<210> 3

<211> 22

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 3

uuugguuccc uucaaccagc ug 22

5	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 4 acatacttct ttacattcca	20
15	<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 5 acaaattcgg ttctacaggg t	21
25	<210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 6 cagctggttg aaggggacca a	21
35	<210> 7 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 7 auacauacuu cuuuacauuc ca	22
45	<210> 8 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 8 caaaauucg guucuacagg gua	23
55	<210> 9 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 9 cagcugguug aaggggacca aa	22

5	<210> 10 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 10 atacatactt ctttacattc ca	22
15	<210> 11 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 11 cacaaattcg gttctacagg gta	23
25	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 12 cagctggttg aaggggacca aa	22
35	<210> 13 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 13 ggaccattg gcattctc	18
45	<210> 14 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 14 caggacacag catagaataa tc	22
55	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 15 agtgagaggc aacctggaga	20

5	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 16 acactcggac cacatccttc	20
15	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 17 cagtctggac actggctgaa	20
25	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 18 ctcgctgatt aggctccaac	20
35	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 19 tggtaggta ggagctttgc	20
45	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 20 ttttcgtcg cttggagact	20
55	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 21 catgctccca ggctgtttat	20
65		

5	<210> 22		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 22		
	gtaacttggc agtttcagt	20	
	<210> 23		
	<211> 21		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 23		
20	tgcaacatgt actggcgaag a	21	
	<210> 24		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 24		
	tcttcacaa gcccagg	18	
	<210> 25		
30	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 25		
	acagaggctg gtggcaacc	19	
	<210> 26		
	<211> 25		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 26		
	accattacct tgtcactgtc catga	25	
45	<210> 27		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 27		
	cgggacaagt acaaggcact gcggcagatc egg	33	
	<210> 28		
	<211> 34		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 28		
60	cggttcacacg cgggacgacg cgggacgacg	34	
	<210> 29		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 29		
	cggttcacacg cgggacgacg cgggacgacg	35	
	<210> 30		

5	<210> 28 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 28 ccggatctgc cgcagtcct tgtactccg	30
15	<210> 29 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 29 tgacgatctg gacaacctca agca	24
25	<210> 30 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 30 atccaatggt gtagtcgctg gtga	24
35	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 31 gatacgttct tacagaaggc	20
45	<210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 32 acccatctgg caaaataaac	20
55	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 33 ggaggggatc agtatataca	20
65		

5	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 34 gaagatgatg gagtagatgg	20
15	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 35 caattccttg ctgcttctcc	20
25	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 36 gccttggtt tgctcctcag	20
35	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 37 aaaaagggtg tgaccgagtg	20
45	<210> 38 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 38 gcatcttctt ccccaacaa	20
55	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 39 cctgaacgcc tacaagaagc	20

5	<210> 40 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 40 atggttcca gtttgagtc	20
15	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 41 gagaggagtg aggcaacagg	20
25	<210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 42 acccagaca caggttgag	20
35	<210> 43 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 43 gagacgcgac tttcaggac	20
45	<210> 44 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 44 gatccaaagg ggaaaagcat	20
55	<210> 45 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 45 gttctggcga aaaatcaaa	20

5	<210> 46 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 46 tcgaacaatt gcagcatca	19
15	<210> 47 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 47 cattcctggg gctagtggta	20
25	<210> 48 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 48 ccatctgaac caaggcattt	20
35	<210> 49 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 49 atcccgtgga gtgaaggtc	19
45	<210> 50 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 50 tctccagcat cacgtctctg	20
55	<210> 51 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 51 agcccatttt tcattgcac	20

5	<210> 52 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 52 tcgtctggtg ttggttgga	20
15	<210> 53 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 53 cctgagcgtc cagaaatgg	19
25	<210> 54 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 54 ggactgttat tcgaagctg gtt	23
35	<210> 55 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 55 catgaagtgt gacgtggaca	20
45	<210> 56 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 56 cacggagtac ttgcgctcag	20
55	<210> 57 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 57 gactcaaca gcgacaccc	19

5	<210> 58 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 58 gccaaattcg ttgtcatacc a	21
15	<210> 59 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 59 uacauacuuc uuauguaccc	20
25	<210> 60 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 60 acagauucga uucuagggga au	22
35	<210> 61 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 61 agcugguaaa auggaaccaa au	22
45	<210> 62 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(19) <223> ARN	
60	<400> 62 ccacuagagu gguggaaaat t	21
65	<210> 63 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
5	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
	<400> 63	
10	uuuuccacca cucuaguggt t	21
	<210> 64	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
	<400> 64	
25	ggacugggcu gaaguacaat t	21
	<210> 65	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
40	<400> 65	
	uuguacuuca gcccagucct t	21
	<210> 66	
45	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
55	<400> 66	
	ccgagaaguu ugugguaat t	21
	<210> 67	
60	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Oligonucleótido sintético	

	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(19)		
	<223> ARN		
5			
	<400> 67		
	uuuaccacaa acuucucggt t	21	
10			
	<210> 68		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15			
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
20			
	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(19)		
	<223> ARN		
	<400> 68		
	cuuccuaauc cgagacacat t	21	
25			
	<210> 69		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30			
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35			
	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(19)		
	<223> ARN		
40			
	<400> 69		
	ugugucucgg auuaggaagt t	21	
45			
	<210> 70		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50			
	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(19)		
	<223> ARN		
55			
	<400> 70		
	ccagaggauu ugccagaaat t	21	
60			
	<210> 71		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65			
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<220>		
	<221> misc_feature		

	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
	<400> 71	
5	ugugucucgg auuaggaagt t	21
	<210> 72	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
	<400> 72	
20	ggugaacacu uaacagcaat t	21
	<210> 73	
	<211> 21	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
35	<400> 73	
	uugcuguuaa guguucacct t	21
	<210> 74	
	<211> 21	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
50	<400> 74	
	gggaugaca gcaagaaat t	21
	<210> 75	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
65	<223> ARN	

	<400> 75	
	auuucuugcu gucauuccct t	21
	<210> 76	
5	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
15	<223> ARN	
	<400> 76	
	ccauaaugaa ggaggucuut t	21
	<210> 77	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
30	<223> ARN	
	<400> 77	
	aagaccuccu ucauuauggt t	21
35	<210> 78	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
	<400> 78	
50	ugaccaagau gcucgggaut t	21
	<210> 79	
	<211> 21	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
	<400> 79	
65	aucccgagca ucuuggucat t	21

5	<210> 80		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
10	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(19)		
	<223> ARN		
15	<400> 80		
	ggagguaccu ucuuccaaat t	21	
20	<210> 81		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(19)		
	<223> ARN		
30	<400> 81		
	uaucaaacuu ccucuucugt t	21	
35	<210> 82		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
40	<400> 82		
	gctcgagtaa agcaaaacaa aggcacgagc	30	
45	<210> 83		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
55	<400> 83		
	gcggcgcaa ggctgtcac caatgaatga	30	
60	<210> 84		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 84		
	aaatgtcaac cattttgtgt aaacgatta	29	
	<210> 85		

	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 85	
10	aaatggtga catttctca ttaccag	28
	<210> 86	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 86	
20	gctcgagtaa taccgcctgg tatgtctgtg	30
	<210> 87	
	<211> 31	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 87	
	gcggccgcaa tgcagatgcc atttattgg t	31
	<210> 88	
	<211> 29	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 88	
	ttatgtcaac cataaatggc atctgcatt	29
	<210> 89	
45	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 89	
	ttatggtga cataagtata gtcgttat	28
55	<210> 90	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 90	
65	gctcgagtaa ccctgttga caggattgat	30
	<210> 91	

	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 91	
10	gcggccgcaa ttttaaaga aagcatctt tatgg	35
	<210> 92	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 92	
20	tcttatcaac ccacttcagt cagaaatgt	29
	<210> 93	
	<211> 28	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 93	
	agtgggttga taagactgcg aacaatca	28
	<210> 94	
	<211> 32	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 94	
	gctcgagtaa aaacctgtcc tggaattcta cc	32
	<210> 95	
45	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 95	
	gcggccgcaa gatggcctt gggtcaataa	30
55	<210> 96	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 96	
65	ctggatcaac gagctgcct gaaaattac	29
	<210> 97	

	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 97	
10	gctcgttgat ccaggtagaa ttccagga	28
	<210> 98	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 98	
20	gctcgagtaa ctccccagc taggaaacag	30
	<210> 99	
	<211> 28	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 99	
	gcggccgcaa agagatgggg cggtcagt	28
	<210> 100	
	<211> 29	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 100	
	gacgttcaac cgccatcccc agccccaaa	29
	<210> 101	
45	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 101	
	tggcggttga acgtctctgc ccacgttc	28
55	<210> 102	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 102	
65	gctcgagtaa gcgggatgct ttgaacatt	29
	<210> 103	

	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 103		
10	gcggccgcaa ctccagcgtc atagagatcc	30	
	<210> 104		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 104		
20	atcaatcaac caggtgtgga tgaggtcac	29	
	<210> 105		
	<211> 28		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
30	<400> 105		
	acctggttga ttgatggctg ttcaatg	28	

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad eficaz de una molécula antisentido específica para un microARN (miARN) seleccionado de miR-1, miR-10b y miR-133a para su uso en el tratamiento del osteosarcoma en un sujeto que lo necesite.

2. La molécula antisentido para su uso según la reivindicación 1, en donde:

- (a) la molécula antisentido es ARN estabilizado, opcionalmente en donde el ARN estabilizado es un oligonucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA); o
(b) la molécula antisentido es ADN.

3. La molécula antisentido para su uso según la reivindicación 1, en donde la molécula antisentido tiene una longitud de 20-30 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos al menos 90 por ciento idéntica a

5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4),
5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5) o
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6); opcionalmente
en donde la molécula antisentido tiene una longitud de 21-30 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos al menos 95 por ciento idéntica a
5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4),
5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5) o
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6); opcionalmente, además,
en donde la secuencia de la molécula antisentido es
5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 4),
5'-ACAAATTCGGTTCTACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 5) o
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA-3' (SEQ ID NO: 6).

4. La molécula antisentido para su uso según la reivindicación 1, en donde la molécula antisentido tiene una longitud de 20-30 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos al menos 90 por ciento idéntica a

5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7),
5'-CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8),
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9),
5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10),
5'-CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11) o
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12); opcionalmente
en donde la molécula antisentido tiene una longitud de 21-30 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos al menos 95 por ciento idéntica a
5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7),
5'-CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8),
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9),
5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10),
5'-CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11) o
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12); opcionalmente, además,
en donde la secuencia de la molécula antisentido es
5'-AUACAUACUUCUUUACAUUCCA-3' (SEQ ID NO: 7),
5'-CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA-3' (SEQ ID NO: 8),
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 9),
5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3' (SEQ ID NO: 10),
5'-CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 11) o
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3' (SEQ ID NO: 12).

5. La molécula antisentido para su uso según cualquier reivindicación precedente, en donde la molécula antisentido está asociada con un vehículo de suministro de ácido nucleico y/o en donde el osteosarcoma es osteosarcoma metastásico.

6. Un método para evaluar la resistencia del osteosarcoma a una terapia antineoplásica en una muestra de tejido que comprende células de osteosarcoma, que comprende:

aislar de la muestra células que expresan CD133;
medir un primer nivel de expresión por las células que expresan CD 133 de al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a;
poner en contacto las células que expresan CD133 con una terapia antineoplásica; y
medir un segundo nivel de expresión por las células que expresan CD133 del al menos un miARN, en donde un segundo nivel de expresión mayor que el primer nivel de expresión indica que el osteosarcoma es resistente a la

terapia antineoplásica.

7. El método de la reivindicación 6, en donde la terapia antineoplásica se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, doxorubicina, metotrexato y cualquier combinación de los mismos.

5 8. Un método de detección del osteosarcoma en una muestra de tejido de un sujeto, que comprende: realizar un ensayo específicamente capaz de detectar al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a, en donde la detección por el ensayo de la presencia en la muestra del al menos un miARN indica que el sujeto está en riesgo de tener osteosarcoma.

10 9. El método de la reivindicación 8, en donde el tejido es sangre o suero.

10. Un método para controlar el osteosarcoma en una muestra de tejido obtenida de un sujeto que tiene osteosarcoma o que ha sido tratado de osteosarcoma, que comprende:

15 (a) realizar un ensayo específicamente capaz de cuantificar el nivel de expresión de al menos un microARN (miARN) seleccionado del grupo que consiste en miR-1, miR-10b y miR-133a; y
 (b) repetir la etapa (a) en una muestra de tejido obtenida posteriormente del sujeto, en donde un nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida posteriormente mayor que el nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida anteriormente indica que el osteosarcoma es progresivo y un nivel de
 20 expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida posteriormente menor que el nivel de expresión del al menos un miARN en la muestra obtenida anteriormente indica que el osteosarcoma es regresivo.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el tejido es sangre o suero.

Fig. 1

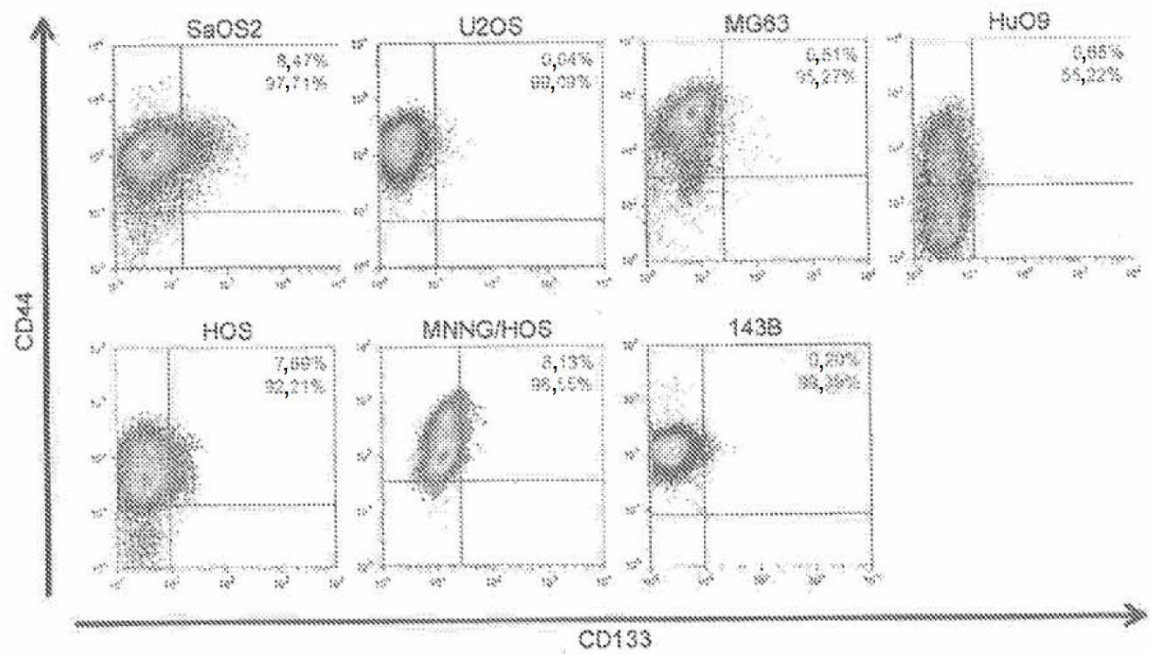


Fig. 2

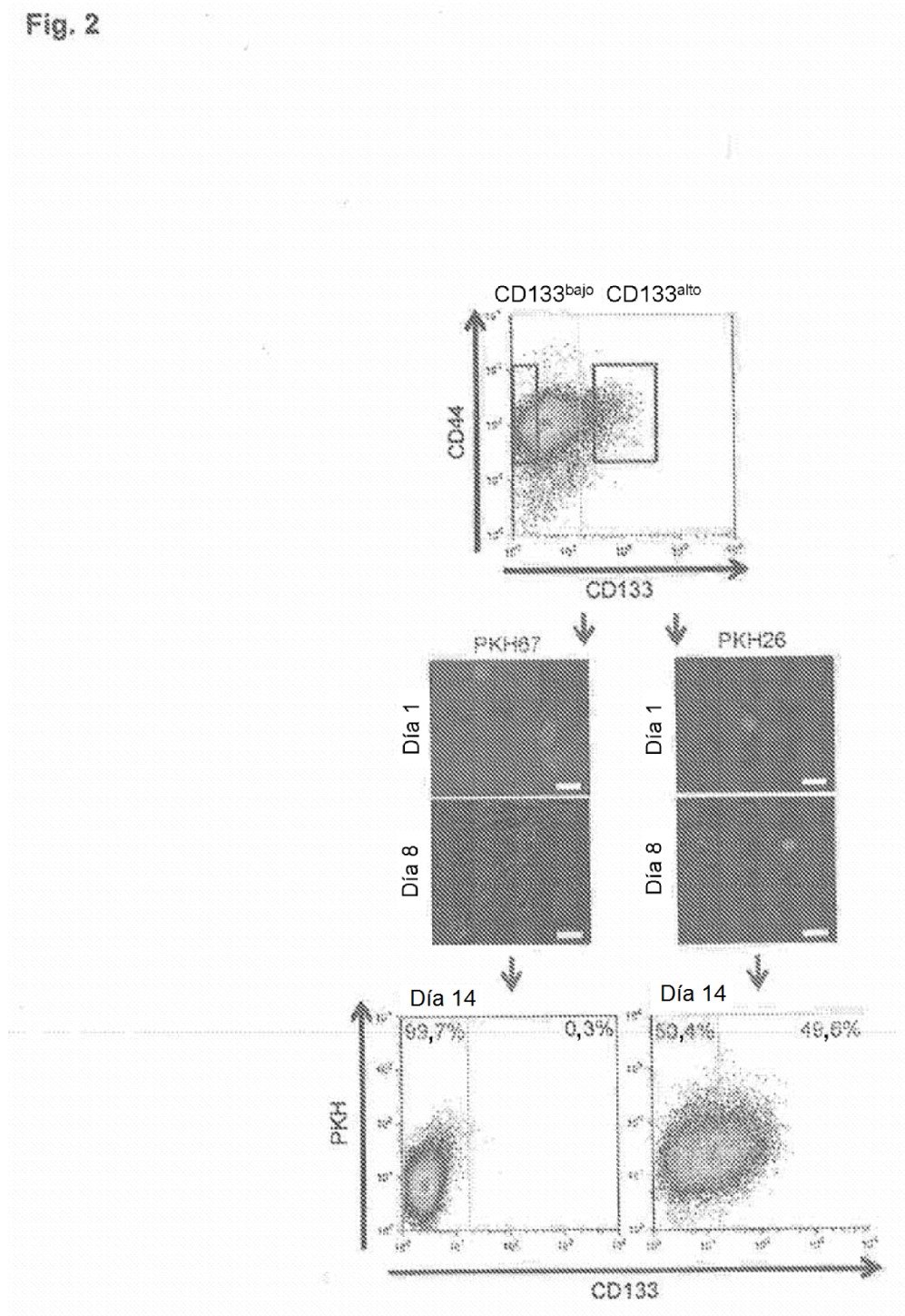


Fig. 2

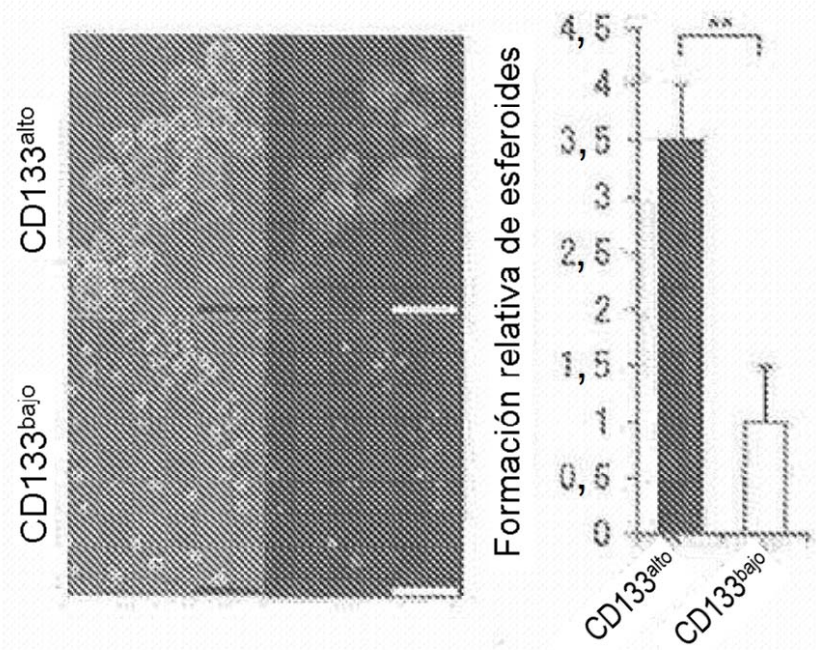


Fig. 4

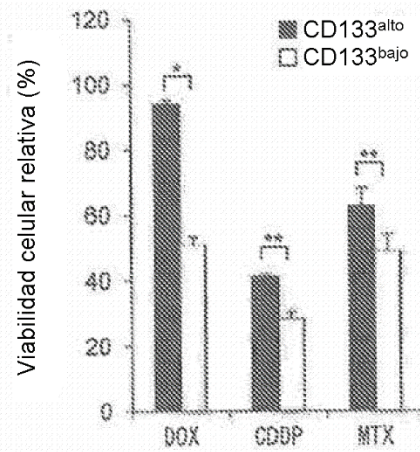


Fig. 5

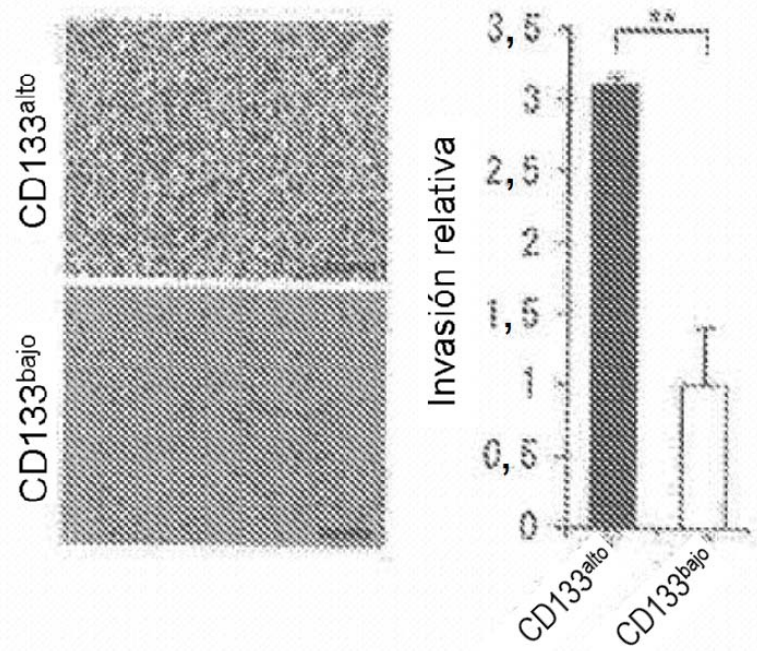


Fig. 6

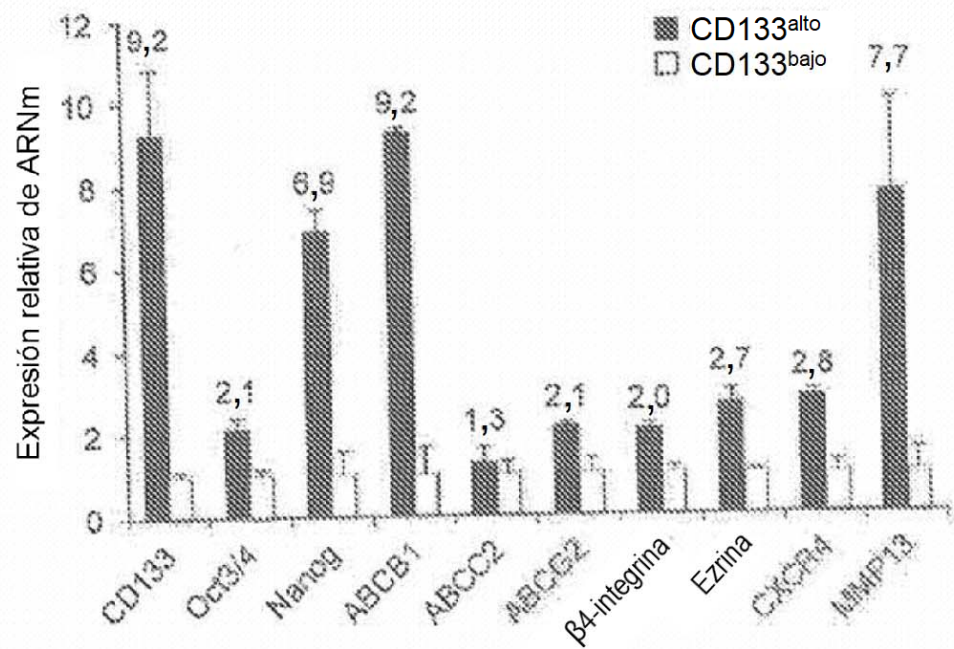


Fig. 7

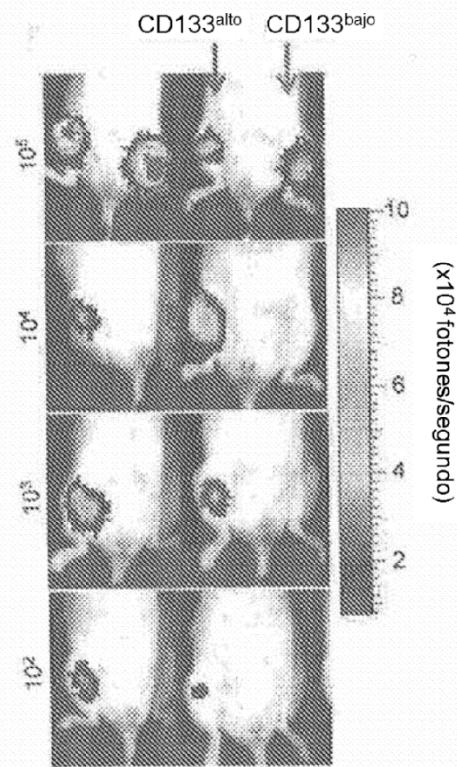


Fig. 8

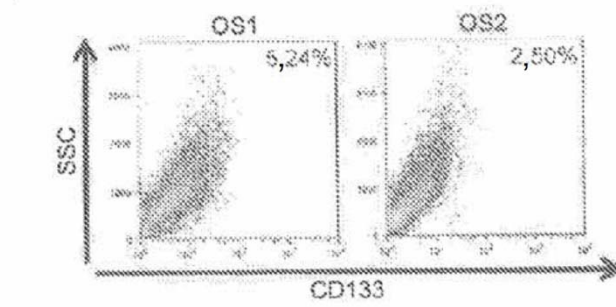


Fig. 9

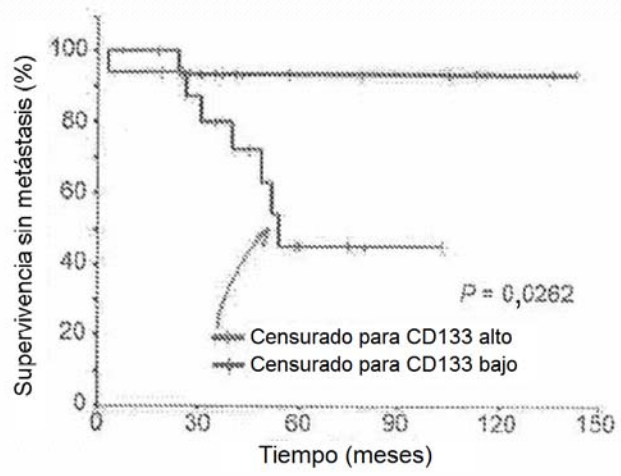


Fig. 10

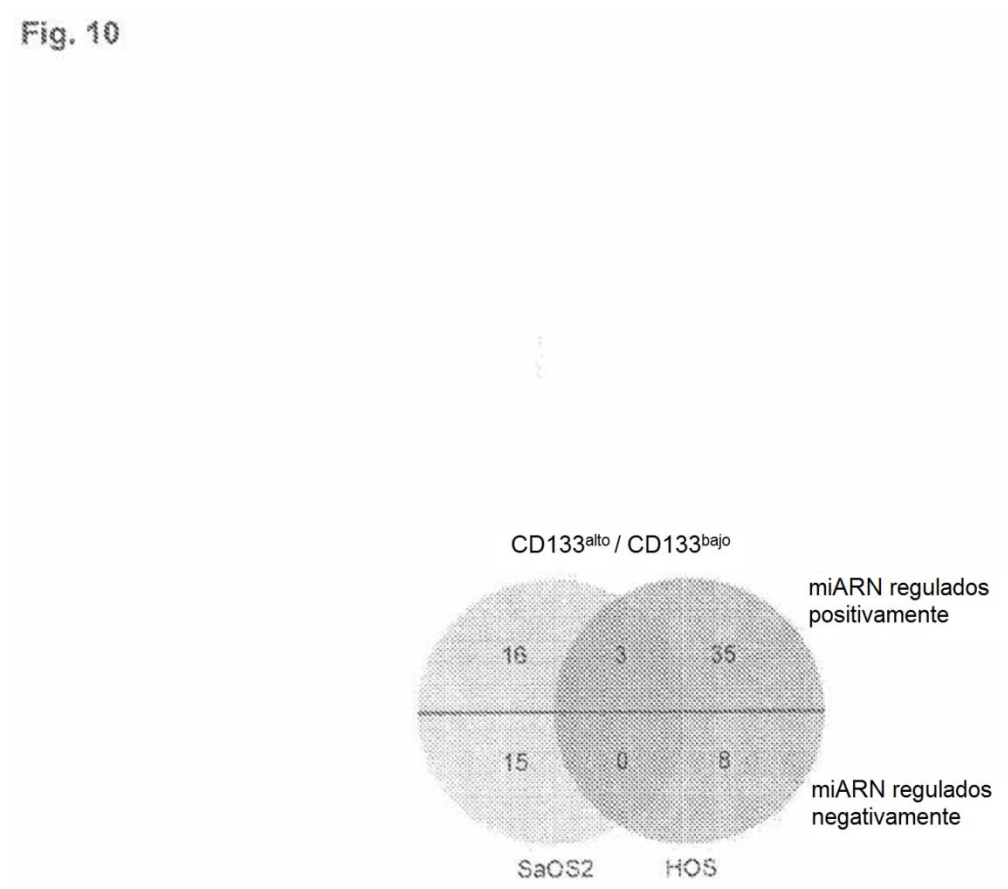


Fig. 11

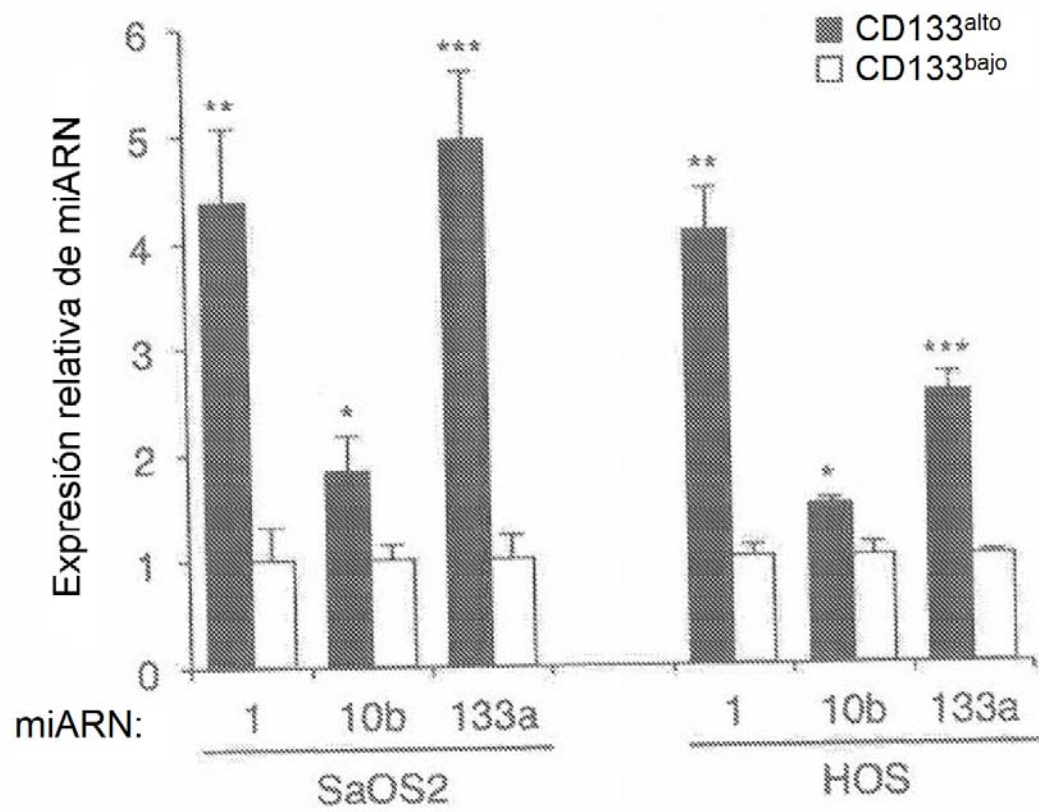


Fig. 12

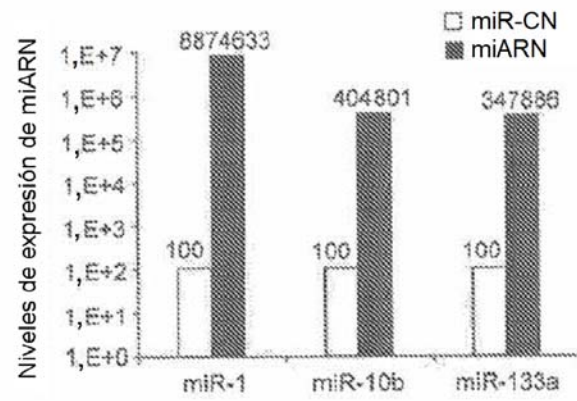


Fig. 13

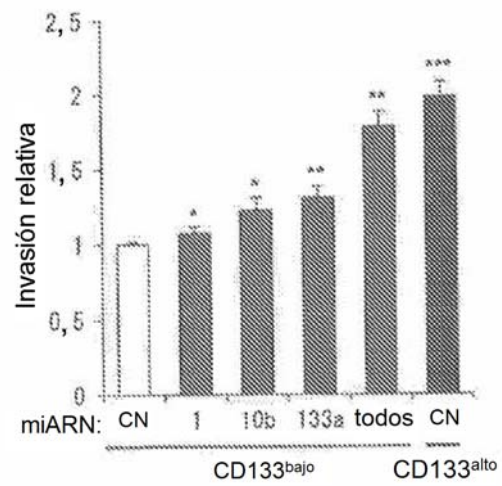


Fig. 14

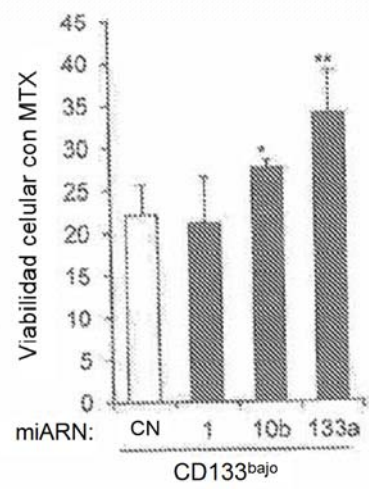


Fig. 15

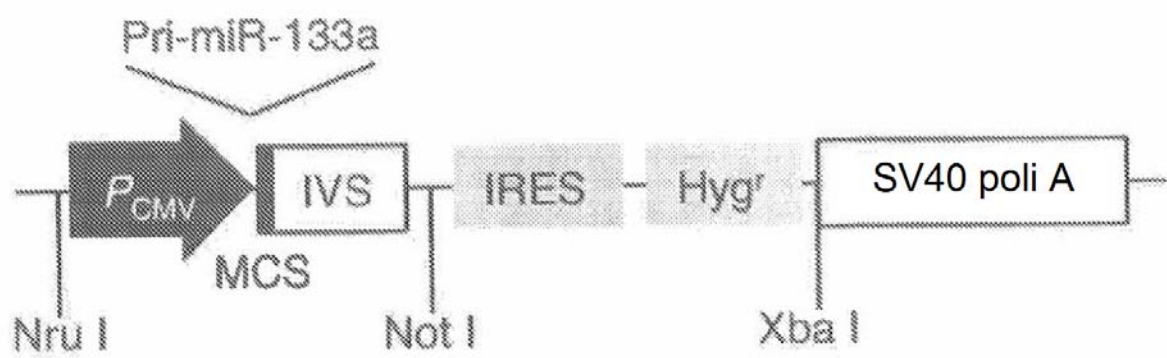


Fig. 16

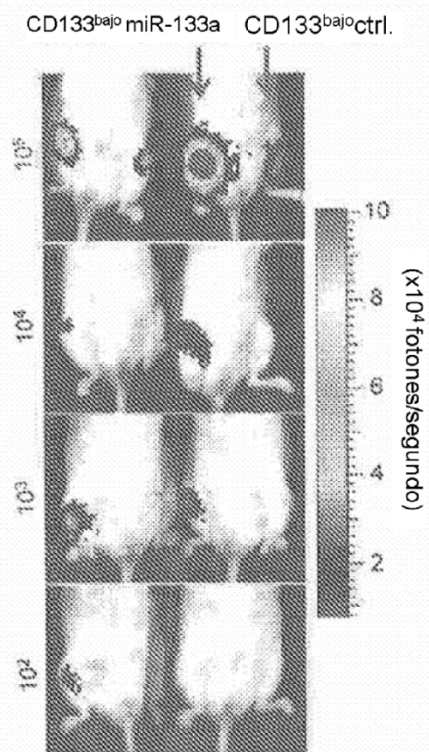


Fig. 17

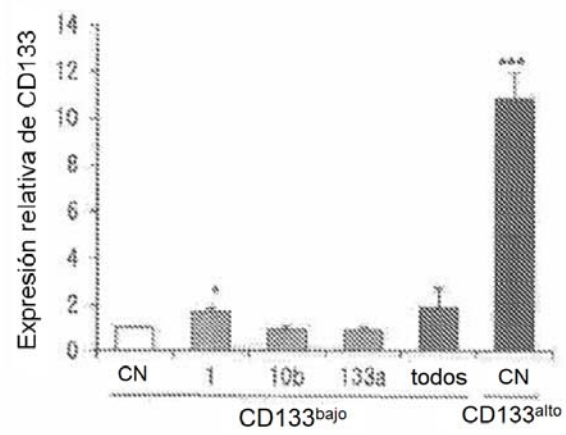


Fig. 18

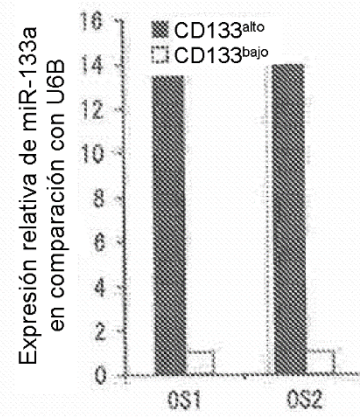


Fig. 19

SaOS2

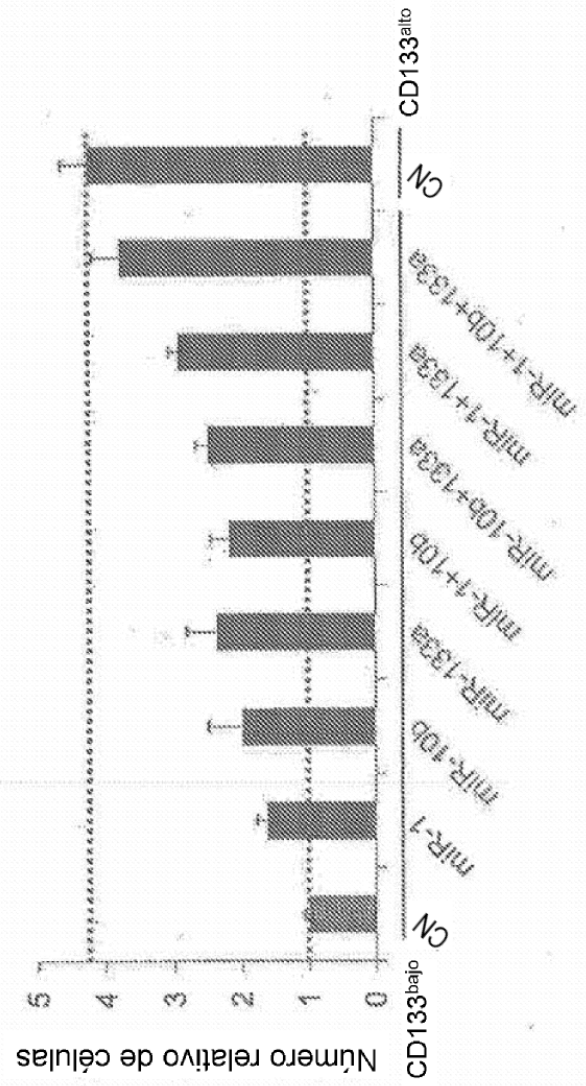
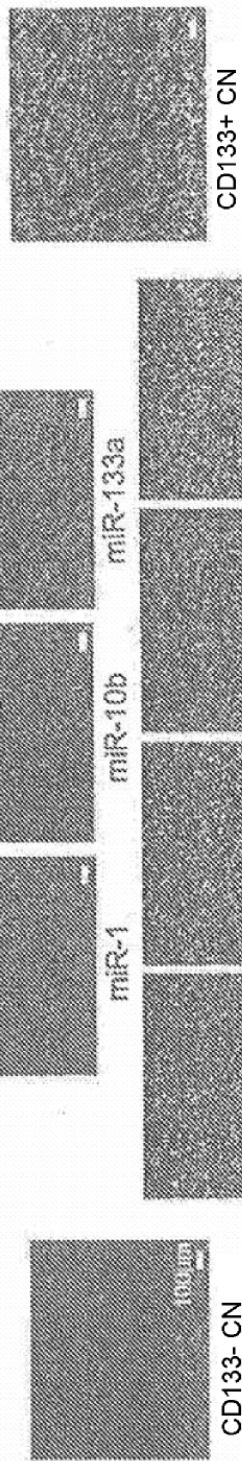


Fig. 20

MNNG/HOS

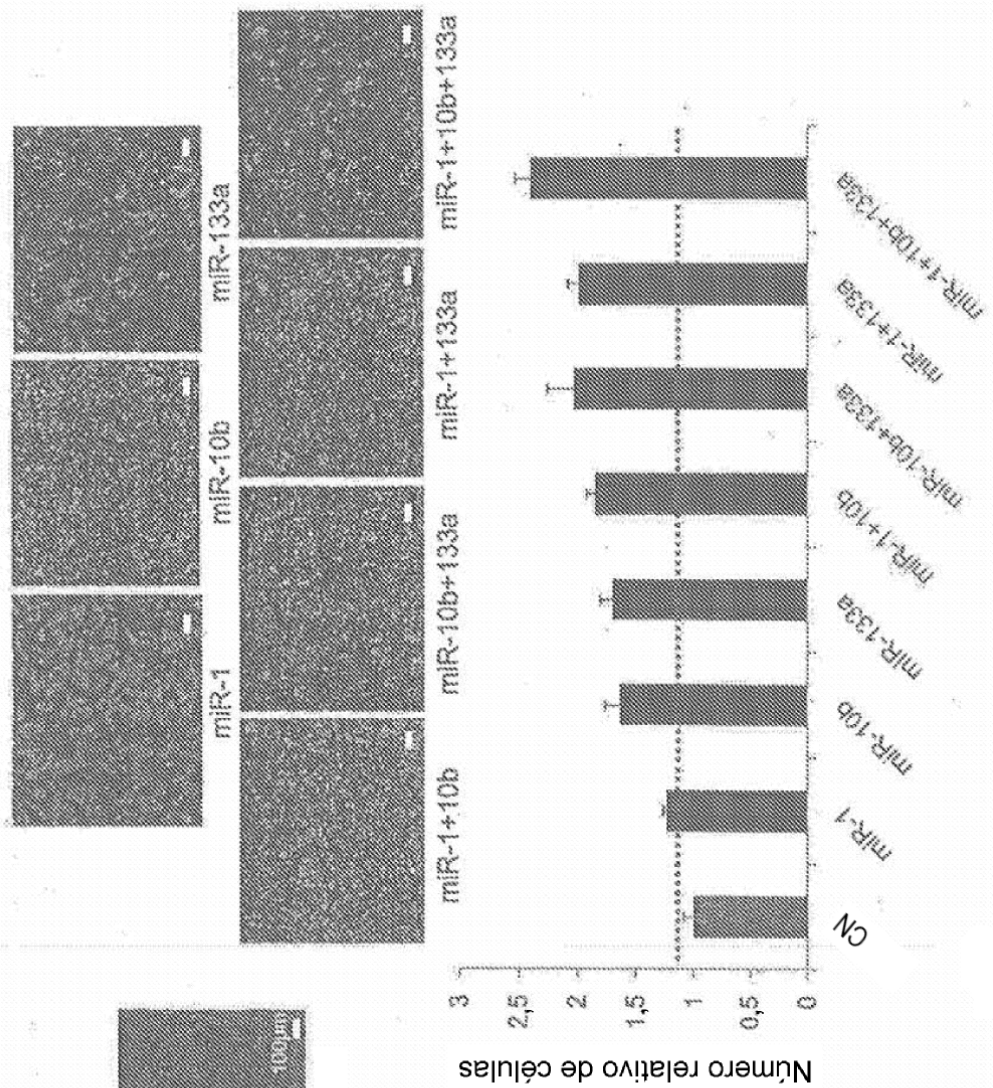
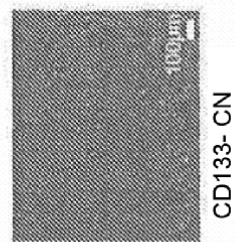


Fig. 21

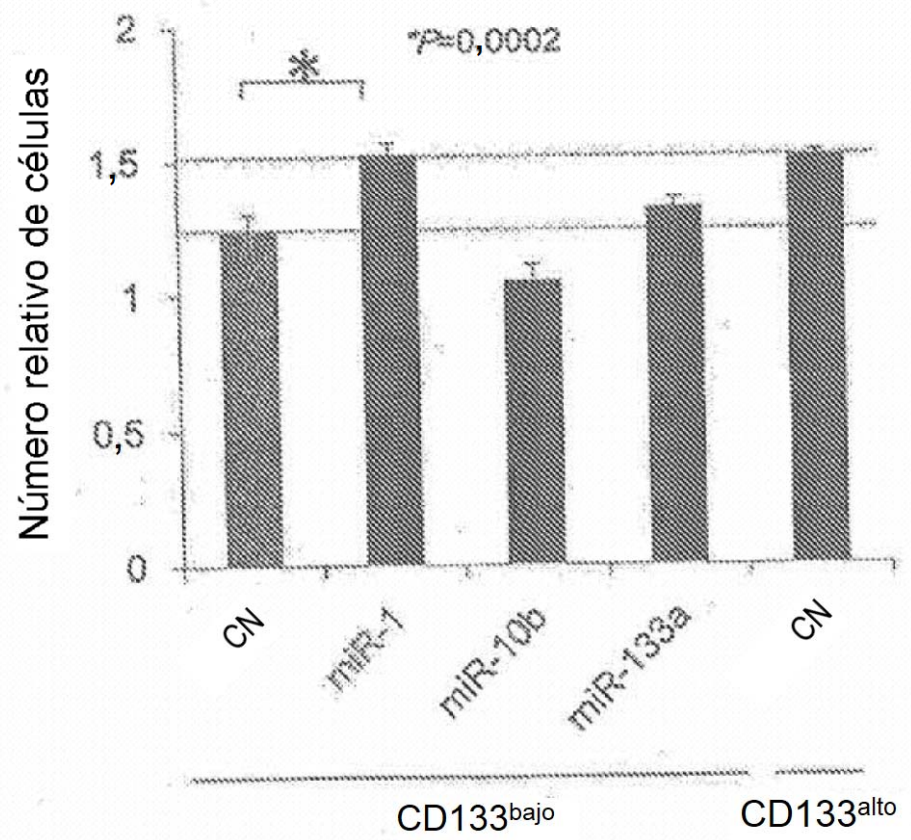


Fig. 22

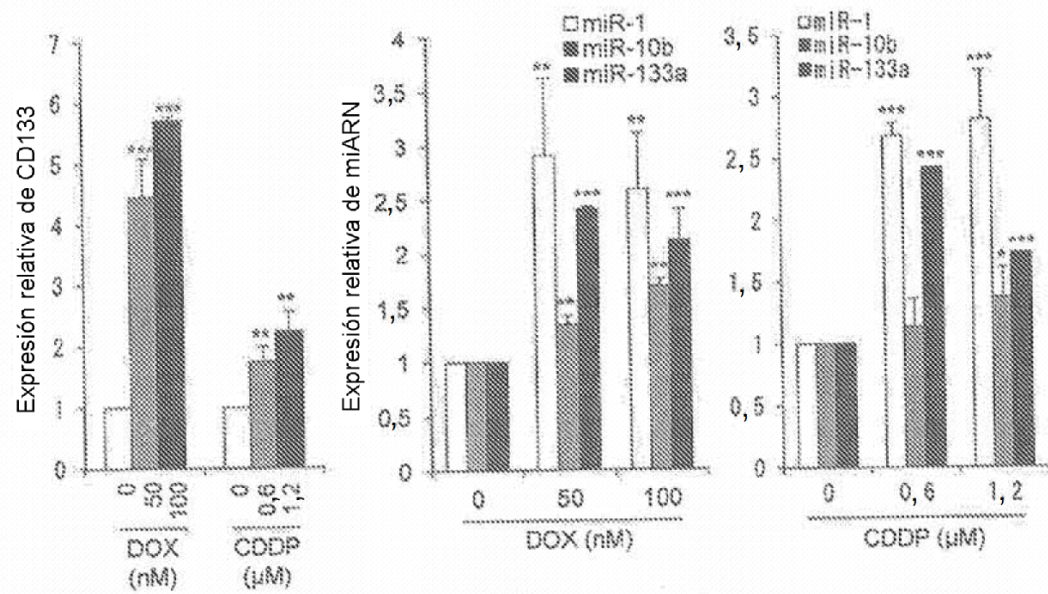


Fig. 23

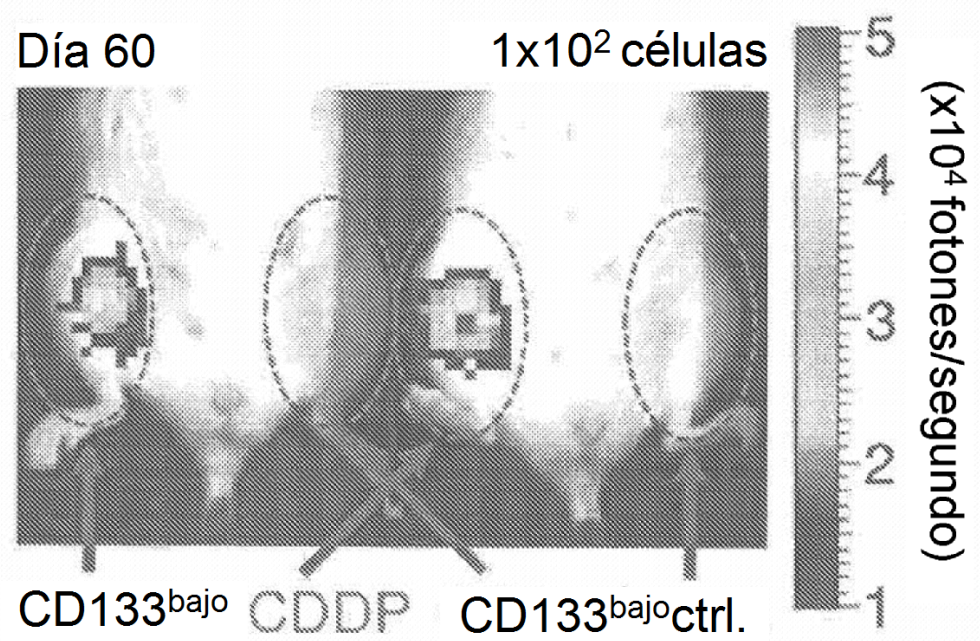


Fig. 24

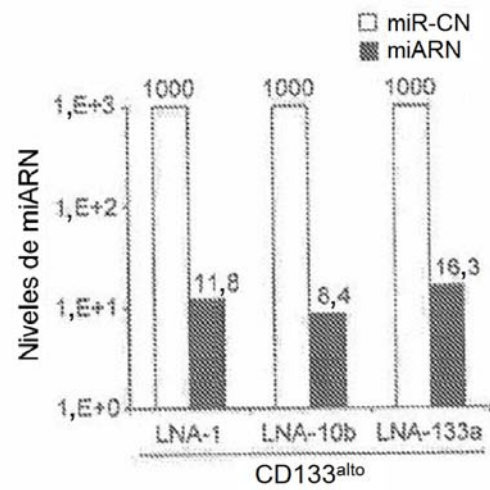


Fig. 25

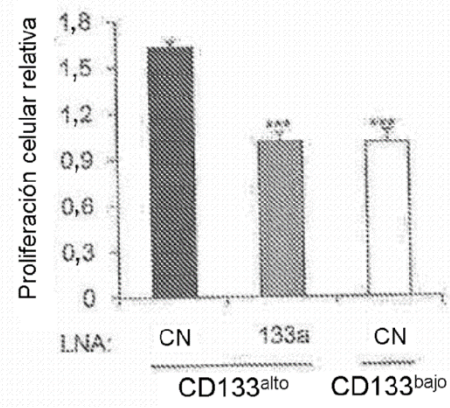


Fig. 26

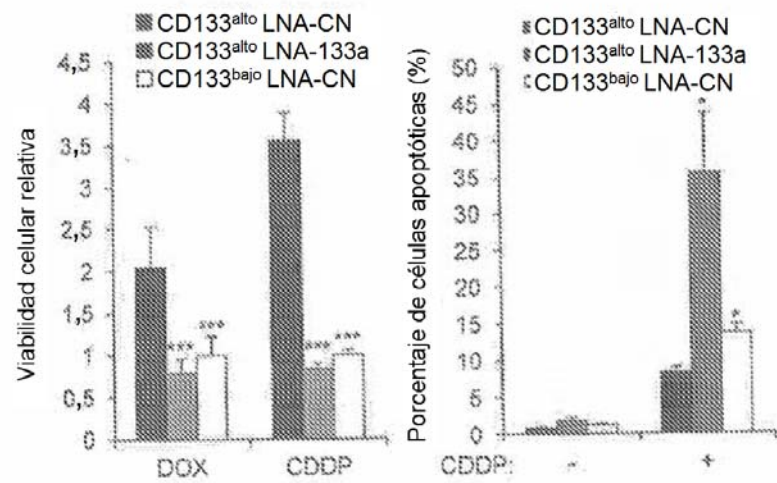


Fig. 27

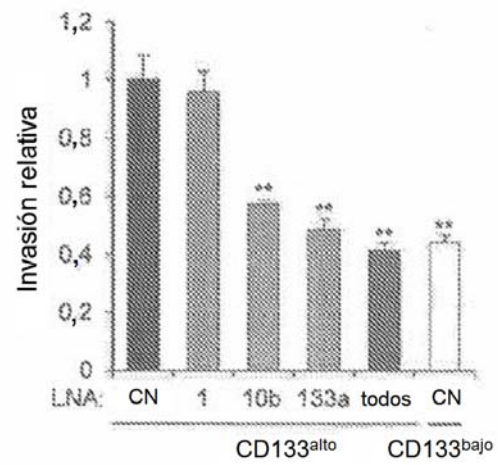


Fig. 28

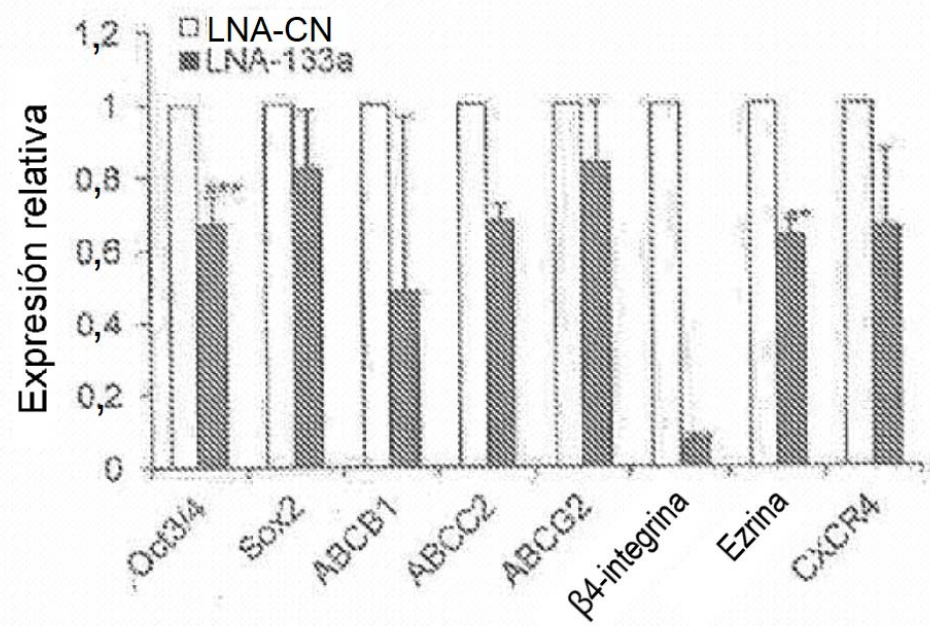


Fig. 29

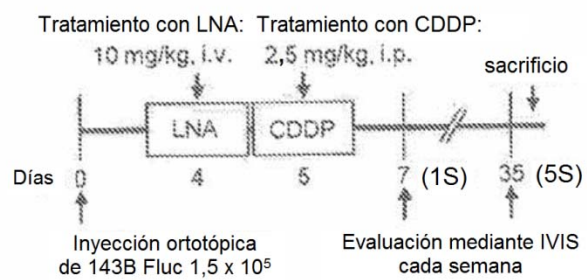


Fig. 30

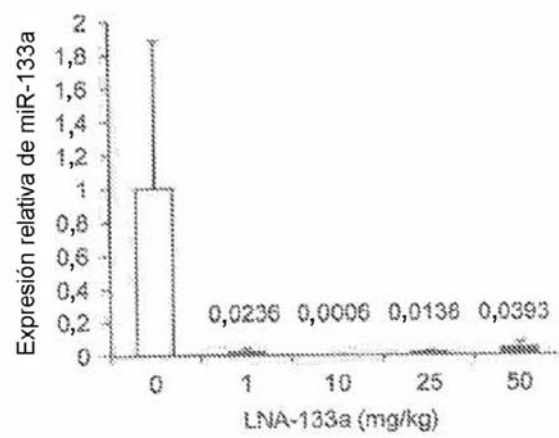


Fig. 31

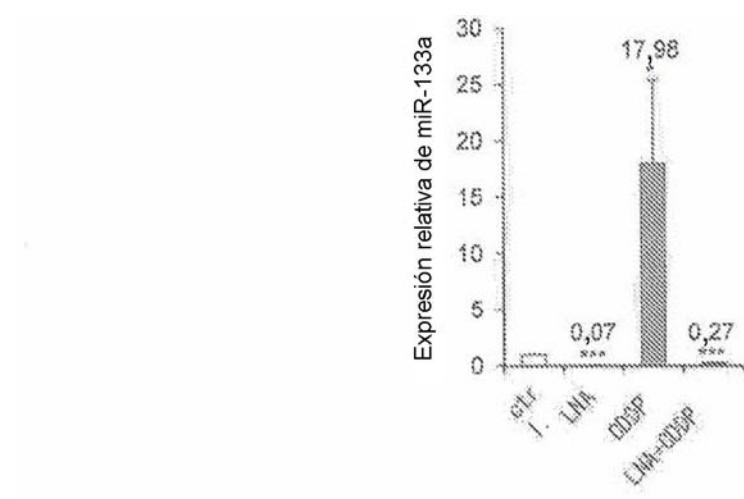


Fig. 32

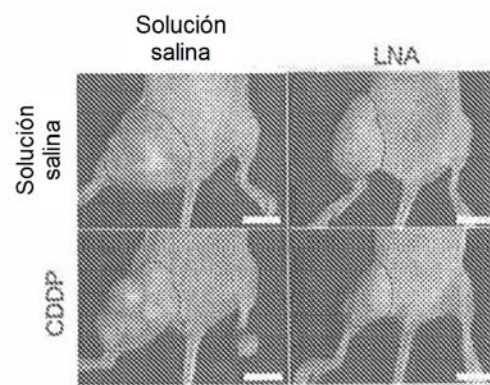


Fig. 33

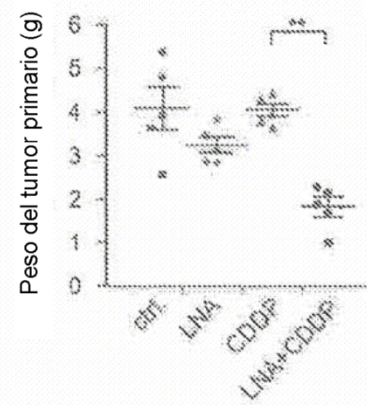


Fig. 34

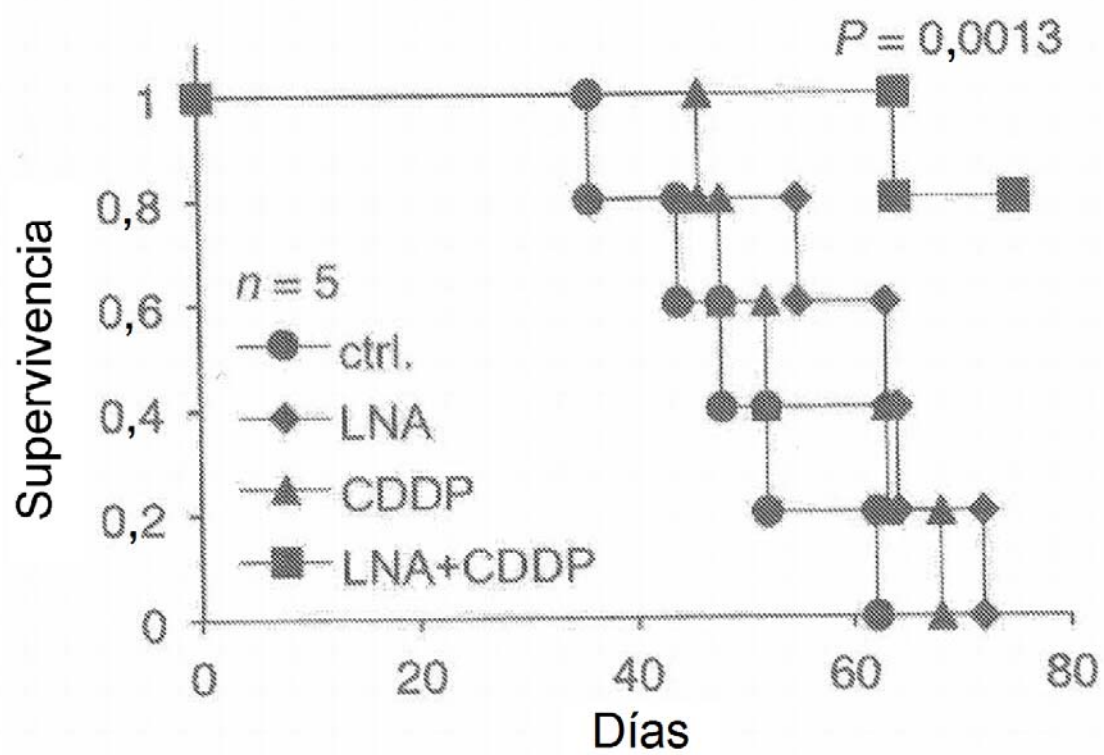


Fig. 35

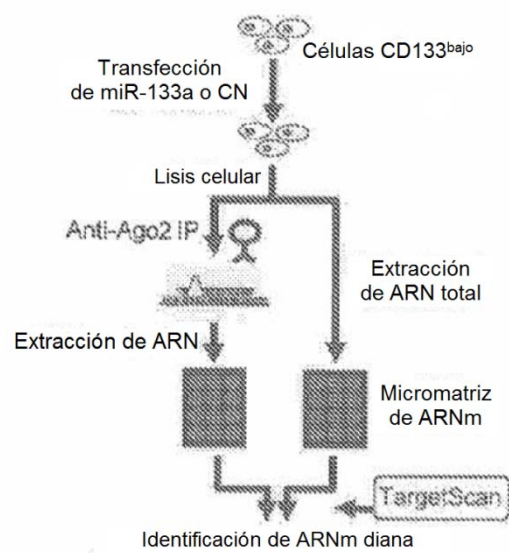


Fig. 36

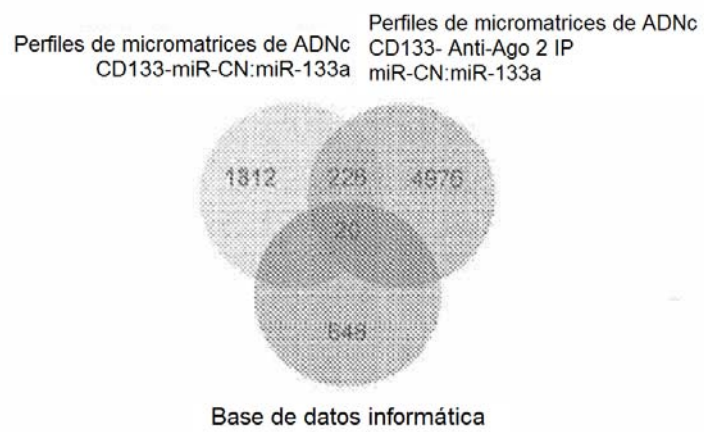


Fig. 37

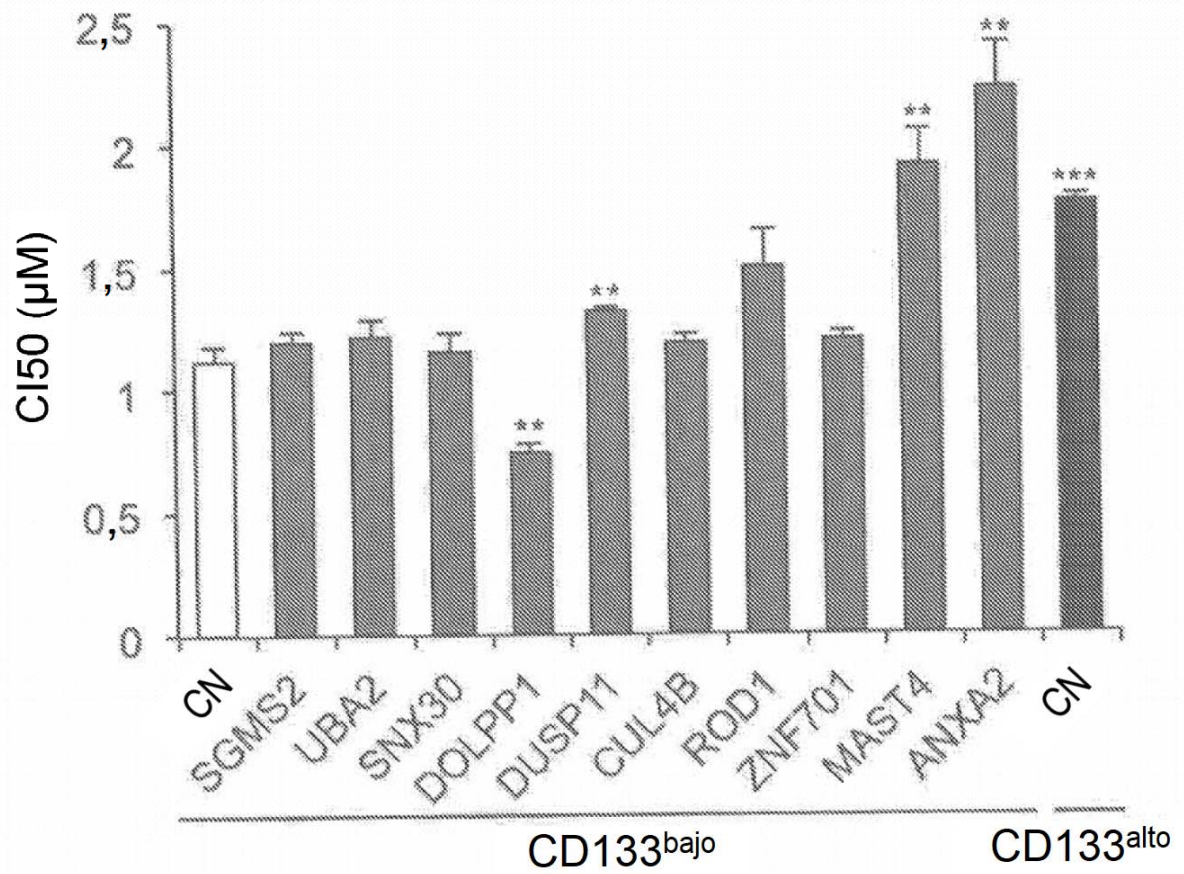


Fig. 38

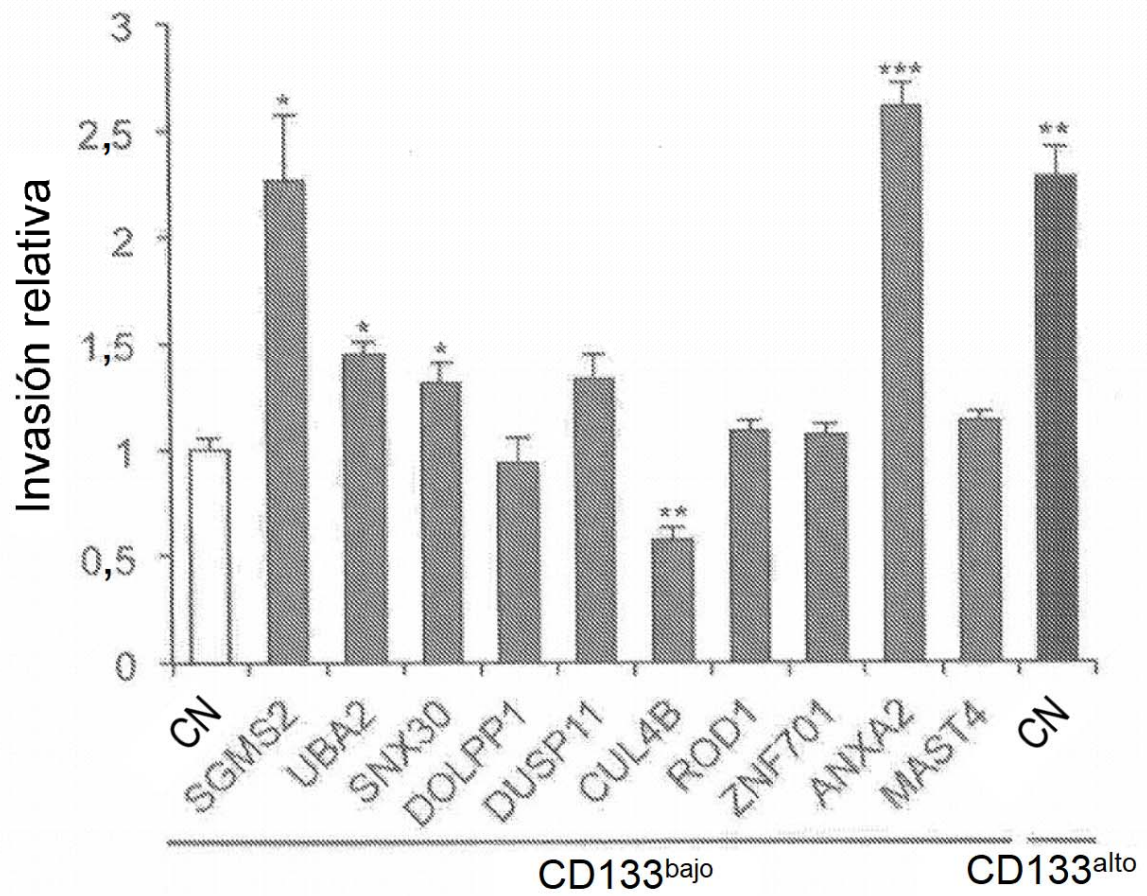


Fig. 39

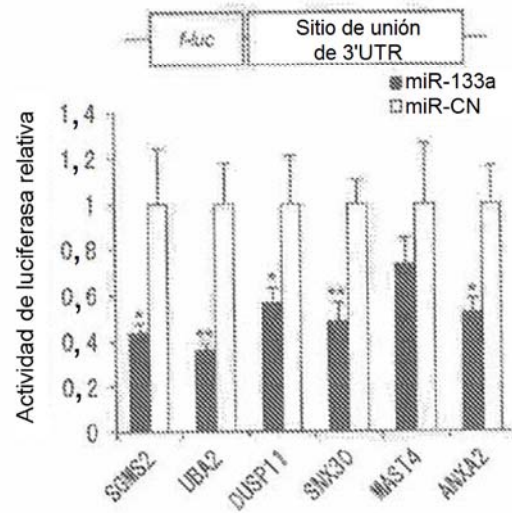


Fig. 40

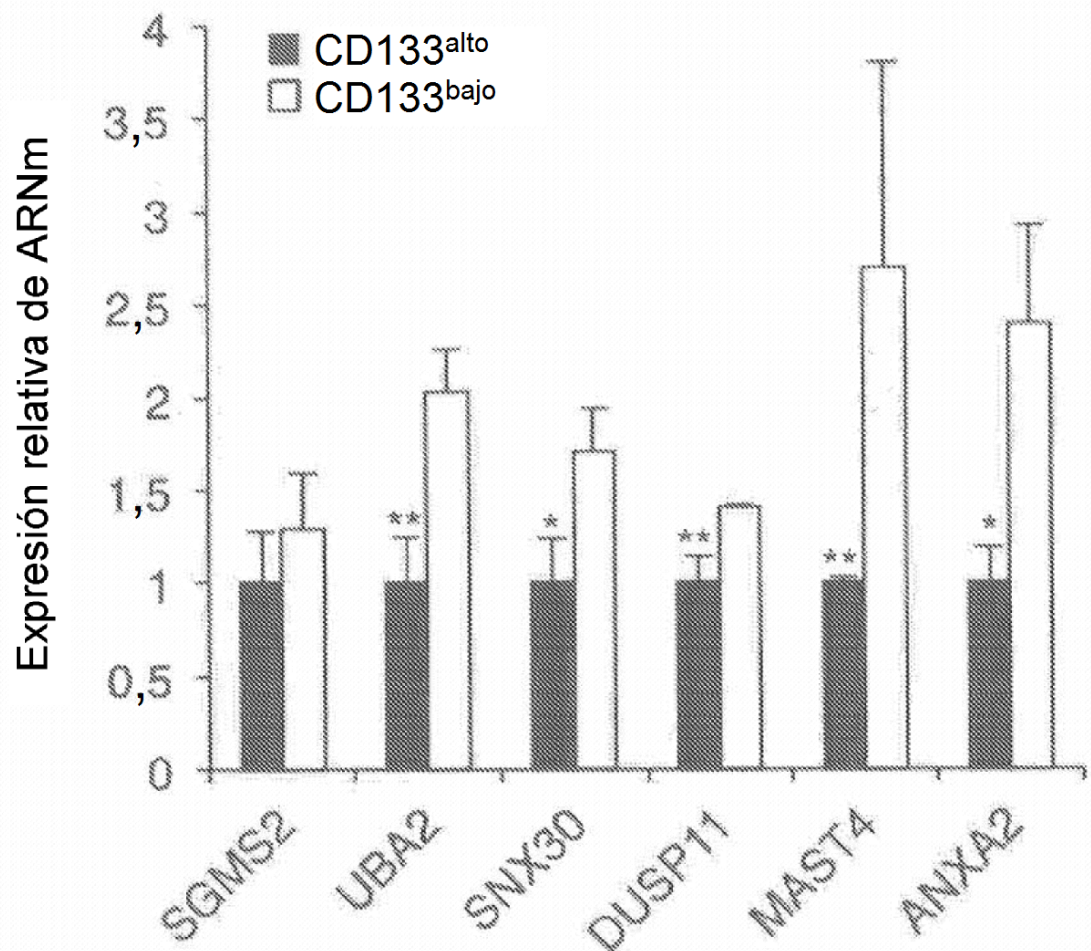


Fig. 41

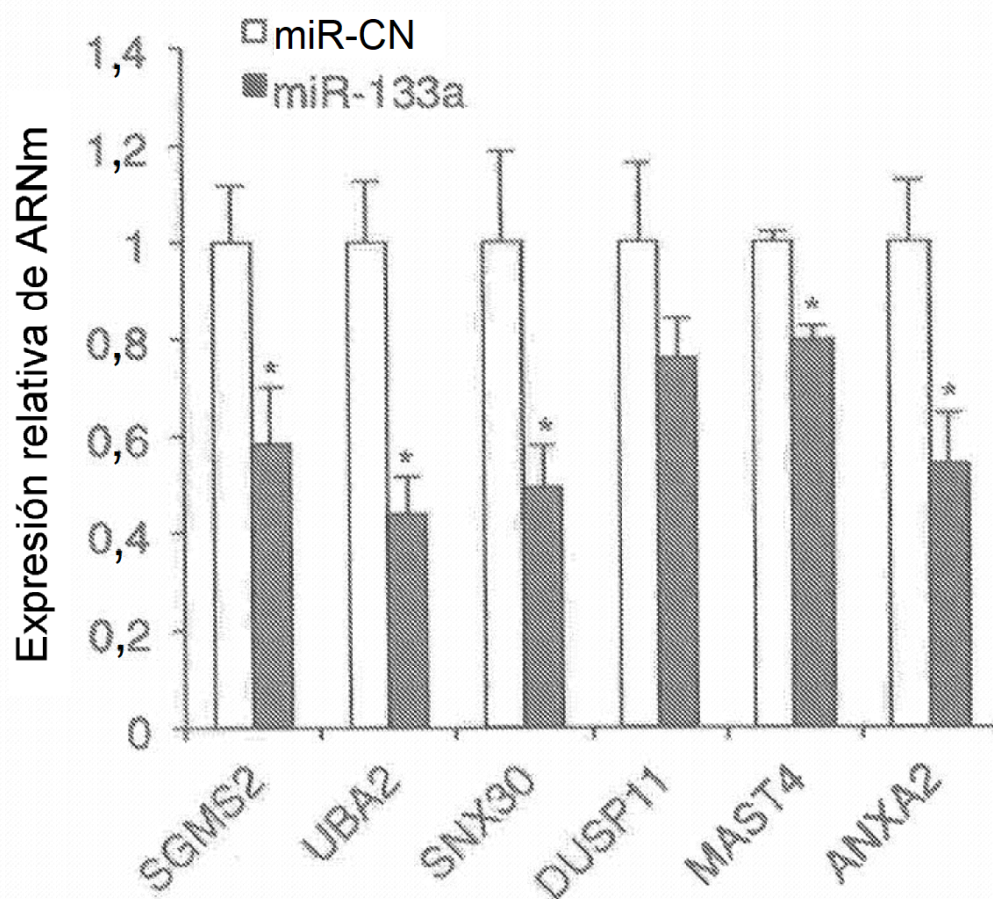


Fig. 42

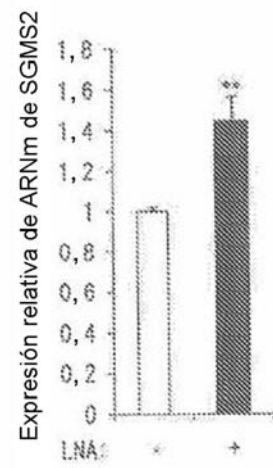


Fig. 43

