

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 172**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2008 E 08796821 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2173911**

54 Título: **Métodos para invertir la metilación por selección dirigida de DNMT3A y DNMT3B**

30 Prioridad:

**31.07.2007 US 962795 P**

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

**18.09.2014**

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION (100.0%)  
1524 North High Street  
Columbus, OH 43201, US**

72 Inventor/es:

**CROCE, CARLO M. y  
FABBRI, MULLER**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 496 172 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 para invertir la metilación por selección dirigida de DNMT3A y DNMT3B

5 **Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/962.795 presentada el 31 de julio de 2007.

10 **Declaración con respecto a la investigación financiada por el Gobierno Federal**

La presente invención se realizó sin subvención Gubernamental por lo que el Gobierno no tiene ningún derecho sobre la misma.

15 **Antecedentes**

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por cáncer en los Estados Unidos, con una frecuencia de aproximadamente 213.000 nuevos casos cada año y una mortalidad muy alta<sup>15</sup>. A pesar de nuevos fármacos y de regímenes terapéuticos, el pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón no ha cambiado significativamente en los últimos 20 años, resaltando la necesidad de nuevas estrategias de tratamiento. La selección dirigida del epigenoma, representa una estrategia terapéutica prometedora en el cáncer<sup>16</sup>.

Se ha observado que la metilación aberrante del ADN desempeña funciones importantes en el cáncer de pulmón<sup>17</sup>:

- 25 1) la metilación de promotores es uno de los mecanismos responsables del silenciamiento de GST<sup>1820</sup> (genes supresores de tumores), tales como CDKN2A, CDH13, FHIT, WWOX, CDH1 y RASSF1A;
- 30 2) la expresión del ARNm de las ADN metiltransferasas de mantenimiento y *de novo*, DNMT1 y DNMT3B, respectivamente, fue supuestamente elevado en el 53 % y 58 % de los 102 NSCLC, respectivamente y el nivel de ARNm de DNMT1 se mostró que era un factor de pronóstico independiente para la supervivencia<sup>13</sup>;
- 35 3) la expresión de las proteínas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B es elevada en tumores de pulmón con respecto a tejido de pulmón normal<sup>12</sup>;
- 4) un polimorfismo específico en el promotor de DNMT3B humano, que aumenta significativamente la actividad del promotor, se ha asociado con un riesgo de cáncer de pulmón aumentado<sup>21</sup>;
- 5) la inhibición de la metilación del ADN mediada por DNMT1 redujo el cáncer de pulmón carcinogénico inducido por tabaco en ratones al >50 %<sup>22</sup>.

Los microARN (miARN), ARN no codificantes de 19-25 nucleótidos que regulan la expresión génica induciendo la inhibición traduccional o la escisión de sus ARNm diana a través del emparejamiento de bases con sitios parcial o completamente complementarios, están implicados en procesos biológicos críticos, incluyendo desarrollo, diferenciación celular, apoptosis y proliferación<sup>1,2</sup>. Recientemente, se han identificado perfiles de expresión específicos de miARN, con implicaciones de diagnóstico y pronóstico, para cánceres específicos (refs. 3-5 para una revisión). De manera destacable, por ordenador se han previsto miembros de la familia miR-29, que previamente muestran estar regulados negativamente en NSCLC<sup>6,7</sup>, que son complementarios a sitios en las regiones 3' no traducidas (3' UTR, *Untranslated Regions*) de los genes de DNMT3A y B, utilizando diferentes algoritmos de predicción de genes diana de miARN (PicTar<sup>8</sup>, TargetScan3.1<sup>9</sup>, MiRanda<sup>10</sup> y miRGen<sup>11</sup>) (**Fig. 1**).

Entre los miARN descritos regulados negativamente en cáncer de pulmón, la familia miR-29 (29a, 29b y 29c) tiene complementariedades intrigantes con las regiones 3' no traducidas (UTR) de DNMT3A y 3B (metil transferasas *de novo*)<sup>8-11</sup>, dos enzimas clave implicadas en la metilación del ADN, que con frecuencia están reguladas positivamente en cáncer de pulmón<sup>12</sup> y asociadas con un mal pronóstico<sup>13</sup>.

Aunque ahora se piensa que los miARN desempeñan una función en la carcinogénesis, la expresión del miARN es diferente en cáncer de pulmón frente a su homólogo normal. Además, el significado de esta expresión aberrante es poco conocida.

Por lo tanto, existe una necesidad de determinar si el miR-29 puede dirigirse tanto a DNMT3A como a DNMT3B y si la restauración del miR-29 puede normalizar patrones de metilación aberrante en cánceres pulmonares tales como, por ejemplo, cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC, *Non-Small Cell Lung Cancer*).

60 **Sumario de la invención**

La invención es como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto general, en este documento se describe un método para restaurar un patrón de metilación del ADN deseado en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más miR-29 suficiente para dirigirse a una o más de DNMT3A y DNMT3B.

- 5 En otro aspecto general, en este documento se describe un método para inducir, en un sujeto que lo necesite, la reexpresión de genes supresores de tumores (GST) silenciada por metilación, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más miR-29 suficiente para dirigirse a una o más de DNMT3A y DNMT3B. En determinadas realizaciones, el GST comprende un o más de FHIT y WWOX.
- 10 En otro aspecto general, en este documento se describe un método para inhibir la tumorigenicidad en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más miR-29 suficiente para dirigirse a una o más de DNMT3A y DNMT3B.
- 15 Los métodos descritos en este documento son útiles en sujetos que padecen cáncer pulmonar no microcítico.
- En otro aspecto, en este documento se describe un método útil para la regulación epigenética de cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC).
- 20 El miR-29b endógeno puede ser útil como un cebador para iniciar la retrotranscripción del ARNm de DNMT3B.
- En otro aspecto, en este documento se describe un método para reducir la metilación de ADN global que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más miR-29 que se dirigen a DNMT3A y DNMT3B, donde la expresión del miR-29 contribuye a modificaciones epigenéticas del ADN en una célula cancerosa.
- 25 En otro aspecto, en este documento se describe un método para realizar la hipometilación del ADN combinando al menos un análogo de nucleósido con uno o más miR-29 suficiente para bloquear las rutas *de novo* y de mantenimiento de DNMT. En determinadas realizaciones, el análogo de nucleósido comprende decitabina.
- 30 En otro aspecto, en este documento se describe un método para aumentar la expresión de un gen supresor de tumor (GST) que comprende transfectar una célula con uno o más mi-R29s. En determinadas realizaciones, el GST comprende una o más de las proteínas FHIT y WWOX.
- En otro aspecto, en este documento se describe un método para inhibir el crecimiento celular *in vitro* y/o inducir la apoptosis con respecto a controles mezclados en las células, que comprende transfectar una o más células con uno o más miR-29.
- 35 En otro aspecto, en este documento se describe un método para modular negativamente niveles de expresión de las enzimas FHIT y/o WWOX, que comprende regular la DNMT3A y/o DNMT3B transfectando la célula con uno o más miembros de la familia miR-29. En determinadas realizaciones, la célula es una célula de cáncer de pulmón.
- En otro aspecto, en este documento se describe un método para reducir la metilación de ADN global que comprende inducir la expresión de mi-R29s en células de cáncer de pulmón.
- 40 En otro aspecto, en este documento se describe un método para reestablecer la expresión de GST que comprende inducir la expresión de mi-R29s en células de cáncer de pulmón.
- En otro aspecto, en este documento se describe un método para inhibir la tumorigenicidad que comprende inducir la expresión de mi-R29s en células de cáncer de pulmón.
- 45 En otro aspecto, en este documento se describe un método para desarrollar una terapia epigenética utilizando miR-29 sintético, en solitario o en combinación con otros tratamientos, para reactivar supresores tumorales y normalizar patrones de metilación aberrante en una célula de cáncer de pulmón.
- 50 En otro aspecto, en este documento se describe un método para diagnosticar si el sujeto tiene, está en riesgo de desarrollar, o tiene un pronóstico de supervivencia disminuido para, una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, que comprende medir el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo del sujeto; en el que una alteración en el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control, es indicativo de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón; y en el que el al menos un producto génico de miR se selecciona del grupo que consiste en miR29a, miR-29b, miR-29c y combinaciones de estos.
- 55 En otros aspectos adicionales, en este documento se describen marcadores asociados con un estado de diversas células inducido por cáncer de pulmón. Se ha descubierto que un nivel de expresión más alto de lo normal de cualquiera de estos marcadores o combinación de estos marcadores se correlaciona con la presencia de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en un paciente. Se desvelan métodos para detectar la presencia de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en una muestra; la ausencia de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en una muestra; la fase de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, y, otras características de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón que son importantes para la evaluación, prevención, diagnóstico, caracterización y terapia de una enfermedad relacionada con pulmón en un paciente.
- 60 También se desvelan métodos de tratamiento de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.
- 65

Aun en otros aspectos, en este documento se describen métodos para tratar a un paciente que padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Dichos métodos pueden comprender reducir la expresión y/o interferir con la función biológica de un marcador. En una realización, el método comprende proporcionar al paciente un oligonucleótido o polinucleótido antisentido complementario con un ácido nucleico marcador, o un segmento del mismo. Por ejemplo, puede proporcionarse un polinucleótido antisentido al paciente a través de la administración de un vector que exprese un polinucleótido antisentido de un ácido nucleico marcador, o un fragmento del mismo. En otra realización, el método comprende proporcionar al paciente un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que se una específicamente con una proteína marcadora, o con un fragmento de la proteína.

Diversos objetos y ventajas de la presente invención resultarán obvios para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas, cuando se lee a la vista de los dibujos adjuntos.

**Breve descripción de los dibujos**

La patente o archivo de solicitud contiene al menos un dibujo realizado a color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo (dibujos) a color las proporcionará la Oficina tras su solicitud y pago de la tasa necesaria.

**Figura 1.** Sitios de complementariedad para los miR-29 en la región 3' UTR de DNMT3A y 3B.

- Hsa-mi-R29a [SEC ID Nº: 1]
- Hsa-mi-R29b [SEC ID Nº: 2]
- Hsa-mi-R29c [SEC ID Nº: 3]
- 845-869 DNMT3A [SEC ID Nº: 4]
- 843-869 DNMT3A [SEC ID Nº: 5]
- 846-869 DNMT3A [SEC ID Nº: 6]
- 1184-1209 DNMT3B [SEC ID Nº: 7]
- 244-267 DNMT3B [SEC ID Nº: 8]
- 1374-1398 DNMT3B [SEC ID Nº: 9]
- 1182-1209 DNMT3B [SEC ID Nº: 10]
- 1185-1209 DNMT3B [SEC ID Nº: 11]

Las letras mayúsculas y en negrita identifican emparejamientos perfectos de bases, de acuerdo con el programa informático TARGETSCAN 3.1. El programa informático PICTAR identifica dos regiones emparejadas adicionales entre miR-29a y DNMT3B, indicadas con un asterisco, \*.

**Figura 2.** MiR- 29s directamente dirigido a DNMT3A y B.

**Figura 2a).** Resultados del ensayo luciferasa para la expresión de las DNMT3 después de transfección con miR-29 en células A549.

**Figura 2b).** Parte superior, valoración de la expresión de los ARNm de DNMT3A y DNMT3B por cRT-PCR, después de transfección de células A549 con miR-29 o con un control negativo; parte inferior, el silenciamiento de miR-29 con moléculas antisentido (AS) induce la expresión aumentada del ARNm de DNMT3A y DNMT3B.

**Figura 2c).** Transferencia de western de proteínas extraídas de células A549 que se cotransfectaron con los vectores de represión-PFV para las 3'UTR de las DNMT3A y B más miR 29s u oligonucleótidos mezclados.

**Figure 2d).** El miR-29b actúa como un cebador endógeno para retrotranscribir su diana de ARNm de DNMT3B prevista. Con letra de color negro: ADNc de DNMT3B (RefSec Nº NM\_175848); con letra de color azul: los ADNc clonados y secuenciados experimentalmente obtenidos (8 clones analizados); con letra de color rojo: secuencias de ARN deducidas y miR-29b correspondiente.

3'UTR-DNMT3B 1178-1217: TTTAACACCTTT-TACTCTTCTTAC-TGGTGCTATTTTGTAG [SEC ID Nº: 12]

DNAc (8): TTTAACACCTTTTACTCTTCT-TAA-TGGTGCTA-ADAPTADOR [SEC ID Nº:13]

ARN: 3' AAAUGAGAAGAAUU:ACCACGAU 5' [SEC ID Nº: 14]

Hsa-miR-29b: 3' UUUGUGACUAAAGUUUACCAC-GAU 5' [SEC ID Nº: 2]

Los nucleótidos de color negro y azul con subrayado superior no tienen homología entre los ADNc diana y experimentales. Los nucleótidos de color rojo con subrayado inferior representan secuencias de ARN complementarias a los ADNc que carecen de homología con la secuencia miR-26b. Los nucleótidos en negrita representan el sitio de emparejamiento previsto PICTAR.

**Figura 3.** Efecto de la restauración de miR-29 sobre el epigenoma de células cancerosas.

**Figura 3a).** Cambios de metilación de ADN global inducidos por miR-29 en células A549 recogidas 48 y 72 horas después de la transfección. Los resultados se compararon con células no transfectadas (control) y células transfectadas con un oligonucleótido mezclado (Mez). El estado de metilación del ADN global se determinó por CL/EM-EM.

**Figura 3b).** Determinación de los niveles de ARNm de FHIT y WWOX en células A549 y H1299, 48 horas después de la transfección con miR-29 o con un control negativo, por cRT PCR; re-expresión de los ARNm de FHIT y WWOX inducida por miR-29.

5 **Figura 3c).** Inmunotransferencia de las proteínas FHIT y WWOX en células A549 y H1299, 72 horas después de la transfección con miR-29 o con un control negativo; por expresión aumentada inducida por miR-29 durante 72 h de las proteínas FHIT y WWOX. Los números encima de las imágenes de inmunotransferencia representan la intensidad de las bandas con respecto al gen GAPDH (fila superior: FHIT; fila inferior: WWOX).

10 **Figura 3d).** Representación gráfica de los datos de metilación de ADN cuantitativos para la región promotora de FHIT y WWOX utilizando el sistema MassARRAY. Cada cuadrado representa una sola CpG o un grupo de CpG analizado, y cada fila representa una muestra. Se presentan frecuencias de metilación de cada experimento en un código de color que se extiende de verde brillante (frecuencias de metilación más bajas) a rojo brillante (frecuencias de metilación más altas).

15 **Figura 4.** Efectos de miR-29 sobre la tumorigenicidad de células A549.

**Figura 4a).** Curva de crecimiento de células A549 transfectadas *in vitro* con miR-29, oligonucleótidos mezclados (Mez o transfectados de manera simulada (Control). Las curvas representan el número de células promedio de 3 experimentos independientes.

25 **Figura 4b).** El porcentaje en células vivas se midió en células A549 transfectadas con oligonucleótidos mezclados (Mez) o con oligonucleótidos miR-29 (concentración final 100 nM). Después de 24 horas, las células se recogieron y se suspendieron en tampón de unión con anexina V-FITC y yoduro de propidio, seguido de citometría de flujo para evaluar la muerte celular. Las barras de error indican DT.

**Figura 4c).** Curva de crecimiento de tumores injertados en ratones desnudos inyectados con células A549 pretransfectadas (48 h antes de la inyección) con miR-29, con oligonucleótidos mez o transfectadas de manera simulada.

30 **Figura 4d).** Comparación de tamaños de injertos tumorales de células A549 transfectadas con los mirR-29, con mez y de manera simulada, 21 días después de la inyección en ratones desnudos. Las imágenes muestran tumores de tamaño promedio de entre 5 de cada categoría.

35 **Figura 4e).** Pesos tumorales  $\pm$  DT en ratones desnudos.

**Figura 5.** El nivel de expresión de la proteína DNMT3A en NSCLC está inversamente asociado con supervivencia global. La curva de Kaplan-Meier muestra una supervivencia de 172 pacientes con NSCLC con diferentes niveles de expresión de DNMT3A en tumores, con respecto al pulmón normal adyacente. Pacientes con mayor expresión de DNMT3A tuvieron una supervivencia global más corta ( $P=0,029$ ). Hubo una tendencia hacia una asociación similar del nivel de expresión de la proteína DNMT3B con supervivencia pero sin dicha asociación para DNMT1.

45 **Figura 6.** Correlación de niveles de miR-29 con niveles de ARNm de DNMT3A/B endógeno. Correlación inversa entre niveles de ARNm de DNMT3A, 3B endógeno y niveles de miR-29 endógeno, determinada por cRT PCR en 14 NSCLC. R=coeficiente de regresión.  $\square$ = línea de regresión;  $\blacklozenge$ = correlaciones reales de la muestra.

### Descripción de realizaciones

50 A lo largo de esta divulgación, mediante una cita identificativa se hace referencia a diversas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos científicos y técnicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la materia (por ejemplo, en el cultivo de células, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Las técnicas convencionales se utilizan para métodos moleculares, genéticos y bioquímicos que se incluyen en la destreza de la materia. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> Ed., ed. de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Mullis *et al.* Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup>: 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (Hames & Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames & Higgins eds., 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller y Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Volúmenes 154 y 155 (Wu *et al.* eds.), Imunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986); The Laboratory Rat,

editor in chief: Mark A. Suckow; authors: Sharp and LaRegina. CRC Press, Boston, 1988.

Como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma singular “un”, “uno”, “una” y “el”, “la” incluye referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Como se utiliza en el presente documento de forma intercambiable, un “producto génico de miR”, “microARN”, “miR”, “miR” o “miARN” se refiere al transcrito de ARN no procesado (por ejemplo, precursor) o procesado (por ejemplo, maduro) de un gen de miR. Como los productos génicos de miR no se traducen en proteína, la expresión “productos génicos de miR” no incluye proteínas. El transcrito génico de miR no procesado también se denomina “precursor de miR” o “miRprec” y normalmente comprende un transcrito de ARN de aproximadamente 70-100 nucleótidos de longitud. El precursor de miR puede procesarse por digestión con una RNasa (por ejemplo, Dicer, Argonaut, RNasa III (por ejemplo, RNasa III de *E. coli*) en una molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa. Esta molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa también se denomina transcrito génico de miR “procesado” o miARN “maduro”.

Un “marcador” es un gen o una proteína cuyo nivel de expresión alterado en un tejido o célula de su nivel de expresión en una célula o tejido normal o sano está asociado con una patología.

El nivel de expresión “normal” de un marcador es el nivel de expresión del marcador en células pulmonares de un sujeto humano o paciente que no padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Una “sobrexpresión” o “nivel de expresión significativo más alto” de un marcador se refiere a un nivel de expresión en una muestra de ensayo que es mayor que el error típico del ensayo empleado para evaluar la expresión, y en determinadas realizaciones, al menos dos, y en otras realizaciones, tres, cuatro, cinco o diez veces el nivel de expresión del marcador en una muestra control (por ejemplo, una muestra de un sujeto sano que no tiene la enfermedad asociada al marcador) y en determinadas realizaciones, el nivel de expresión promedio del marcador en diversas muestras control.

Un “nivel de expresión significativamente más bajo” de un marcador se refiere a un nivel de expresión en una muestra de ensayo que es al menos dos veces, y en determinadas realizaciones, tres, cuatro, cinco o diez veces más bajo que el nivel de expresión del marcador en una muestra control (por ejemplo, una muestra de un sujeto sano que no tiene la enfermedad asociada al marcador) y en determinadas realizaciones, el nivel de expresión promedio del marcador en diversas muestras control.

Un “kit” es cualquier fabricación (por ejemplo un envase o un recipiente) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, una sonda, para detectar específicamente la expresión de un marcador. El kit puede promocionarse, distribuirse o comercializarse como una unidad para realizar los métodos desvelados en este documento.

“Proteínas” incluyen proteínas marcadoras y sus fragmentos; variantes de proteínas marcadoras y sus fragmentos; péptidos y polipéptidos que comprenden un segmento de al menos 15 aminoácidos de un marcador o proteína marcadora variante; y proteínas de fusión que comprenden un marcador o proteína marcadora variante, o un segmento de al menos 15 aminoácidos de un marcador o proteína marcadora variante.

En un primer aspecto general, en este documento se desvela la identificación de microARN particulares cuya expresión está alterada en células cancerosas asociadas con diferentes cánceres de pulmón, con respecto a células control normales.

La molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa puede obtenerse del precursor de miR a través de rutas de procesamiento naturales (por ejemplo, usando células intactas o lisados celulares) o mediante rutas de procesamiento sintéticas (por ejemplo, usando enzimas de procesamiento aisladas, tales como Dicer, Argonaut o RNasa III aisladas). Se entiende que la molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa también puede producirse directamente por síntesis biológica o química, sin tener que procesarse a partir del precursor de miR. Cuando se hace referencia a un microARN en el presente documento por nombre, el nombre corresponde a las formas tanto precursora como madura, a no ser que se indique de otro modo.

En un aspecto, en este documento se desvelan métodos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer pulmonar, que comprenden medir los niveles de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo del sujeto y comparar el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra control. Como se usa en este documento, un sujeto puede ser cualquier mamífero que tenga, o se sospeche que tenga, una enfermedad pulmonar. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano que tiene, o se sospecha que tiene, un cáncer de pulmón.

En una realización, el al menos un producto génico de miR medido en la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en miR-29a, miR-29b, miR-29c y combinaciones de los mismos. En una realización particular, el producto génico de miR es miR-29b.

La enfermedad relacionada con cáncer de pulmón puede ser cualquier trastorno o cáncer que surja de los tejidos pulmonares. Dichos cánceres están normalmente asociados con la formación y/o presencia de masas tumorales y pueden ser, por ejemplo, cualquier forma de cáncer de pulmón, por ejemplo, cánceres de pulmón de diferente histología (por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas). Además, el cáncer de pulmón puede asociarse con un pronóstico particular (por ejemplo, baja tasa de supervivencia, rápida progresión).

El nivel de al menos un producto génico de miR puede medirse en una muestra biológica (por ejemplo, células, tejidos) obtenida del sujeto. Por ejemplo, puede extraerse una muestra de tejido (por ejemplo, de un tumor) de un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón mediante técnicas de biopsia convencionales. En otra realización, puede extraerse una muestra de sangre del sujeto y las células sanguíneas (por ejemplo glóbulos blancos) pueden aislarse para la extracción de ADN mediante técnicas convencionales. La muestra de sangre o de tejido se obtiene preferentemente del sujeto antes de iniciar la radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento terapéutico. Puede obtenerse una muestra control de tejido o de sangre correspondiente de tejidos no afectados del sujeto, de un individuo normal o de una población de individuos normales, o de células cultivadas que se corresponden con la mayoría de las células en la muestra del sujeto. La muestra control de tejido o de sangre se procesa después junto con la muestra del sujeto, de tal manera que los niveles del producto génico de miR producidos a partir de un gen de miR determinado en las células de la muestra del sujeto puede compararse con los niveles del producto génico de miR correspondientes de las células de la muestra control. Como control también puede utilizarse un patrón de expresión miR de referencia para la muestra biológica.

Una alteración (por ejemplo, un aumento o disminución) en el nivel de un producto génico de miR en la muestra obtenida del sujeto, con respecto al nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra control, indica la presencia de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en el sujeto.

En una realización, el nivel de al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra control (es decir, la expresión del producto génico de miR está "regulada positivamente"). Como se utiliza en este documento, la expresión de un producto génico de miR está "regulada positivamente" cuando la cantidad del producto génico de miR en una muestra de células o tejido de un sujeto es mayor que la cantidad del mismo producto génico en una muestra control de células o tejidos.

En otra realización, el nivel de al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra control (por ejemplo, la expresión del producto génico de miR está "regulada negativamente"). Como se utiliza en este documento, la expresión de un gen de miR está "regulada negativamente" cuando la cantidad del producto génico de miR producida a partir de ese gen en una muestra de células o tejidos de un sujeto es menor que la cantidad producida a partir del mismo gen en una muestra control de células o tejidos.

La expresión del gen miR relativa en las muestras de control y normales puede determinarse con respecto a uno o más patrones de expresión de ARN. Los patrones pueden comprender, por ejemplo, un nivel de expresión del gen miR cero, el nivel de expresión del gen miR en una línea de células patrón, el nivel de expresión del gen miR en tejidos no afectados del sujeto, o el nivel promedio de la expresión del gen miR previamente obtenido en una población de controles humanos normales.

El nivel de un producto génico de miR en una muestra puede medirse utilizando cualquier técnica que sea adecuada para detectar niveles de expresión de ARN en una muestra biológica. Los expertos en la materia conocen bien técnicas adecuadas (por ejemplo, análisis de transferencia de Northern, RT-PCR, hibridación *in situ*) para determinar niveles de expresión de ARN en una muestra biológica (por ejemplo, células, tejidos). En una realización particular, el nivel de al menos un producto génico de miR se detecta utilizando análisis de transferencia de Northern. Por ejemplo, el ARN celular total puede purificarse de las células por homogeneización en presencia de tampón de extracción de ácido nucleico, seguido de centrifugación. Los ácidos nucleicos se precipitan, y el ADN se retira por tratamiento con DNasa y precipitación. Las moléculas de ARN se separan después por electroforesis en gel en geles de agarosa de acuerdo con técnicas convencionales, y se transfieren a filtros de nitrocelulosa. Después el ARN se inmoviliza en los filtros por calentamiento. La detección y cuantificación de ARN específico se realiza utilizando sondas de ADN o ARN marcadas apropiadamente complementarias al ARN en cuestión. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook *et al.*, eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 7.

Para la hibridación por transferencia Northern de un producto génico de miR determinado pueden producirse sondas adecuadas a partir de las secuencias de ácido nucleico e incluyen, sin limitación, sondas que tienen una complementariedad de al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o completa con un producto génico de miR de interés. Los métodos de preparación de sondas de ADN y ARN marcadas y las condiciones para su hibridación con secuencias de nucleótidos diana se describen en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook *et al.*, eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulos 10 y 11.

En un ejemplo no limitante, la sonda de ácido nucleico puede marcarse, por ejemplo, con un radionúclido, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^{35}\text{S}$ ; un metal pesado; un ligando capaz de actuar como un miembro del par de unión específico para un ligando marcado (por ejemplo, biotina, avidina o un anticuerpo); una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, una enzima o similar.

Las sondas pueden marcarse con alta actividad específica por el método de traducción por cortes de Rigby *et al.* (1977), *J. Mol. Biol.* 113: 237-251 o por el método de cebado al azar de Fienberg *et al.* (1983), *Anal. Biochem.* 132: 6-13. Este último es el método de elección para sintetizar sondas marcadas con  $^{32}\text{P}$  de alta actividad específica de ADN monocatenario o de moldes de ARN. Por ejemplo, reemplazando nucleótidos preexistentes con nucleótidos altamente radioactivos de acuerdo con el método de traducción por cortes, es posible preparar sondas de ácido nucleico marcadas con  $^{32}\text{P}$  con una actividad específica muy por encima de  $10^8$  cpm/microgramo. La detección de hibridación autorradiográfica puede realizarse después exponiendo filtros hibridados con películas fotográficas. La exploración densitométrica de las películas fotográficas expuestas por los filtros hibridados proporciona una medición precisa de los niveles de transcripción del gen de miR. Utilizando otra estrategia, los niveles de transcripción del gen de miR pueden cuantificarse por sistemas de obtención de imágenes informatizados, tal como el Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager disponible en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

Cuando el marcaje con radionúclidos de sondas de ADN o ARN no es práctico, puede utilizarse el método de cebado al azar para incorporar un análogo, por ejemplo, el análogo dTTP 5-(N-(N-biotinil-épsilon-aminocaproil)-3-aminoalil) desoxiuridina trifosfato, en la molécula sonda. El oligonucleótido sonda marcado con biotina puede detectarse por reacción con proteínas de unión a biotina, tales como avidina, estreptavidina y anticuerpos (por ejemplo anticuerpos anti-biotina) acoplados a colorantes fluorescentes o a enzimas que producen reacciones de color.

Además de las técnicas de Northern y otras de hibridación de ARN, la determinación los niveles de transcritos de ARN puede realizarse utilizando la técnica de hibridación *in situ*. Esta técnica requiere menos células que en la técnica de transferencia de Northern e implica la deposición de células completas en un cubreobjetos de microscopio y explorar el contenido de ácido nucleico de la célula con una solución que contenga sondas radioactivas o ácido nucleico marcado de otra manera (por ejemplo, ADNc o ARN). Esta técnica es particularmente muy adecuada para analizar muestras de biopsia de tejido de sujetos. La realización práctica de las técnicas de hibridación *in situ* se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos N° 5.427.916.

En un ejemplo no limitante, pueden producirse sondas adecuadas para la hibridación *in situ* de un producto génico de miR determinado a partir de las secuencias de ácido nucleico e incluyen, sin limitación, sondas que tienen una complementariedad de al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o completa con un producto génico de miR de interés, como se ha descrito anteriormente.

El número relativo de transcritos génicos de miR en las células también puede determinarse por transcripción inversa de los transcritos génicos de miR, seguido de amplificación de los transcritos en los que se ha realizado la transcripción inversa mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los niveles de los transcritos génicos de miR pueden cuantificarse en comparación con un patrón interno, por ejemplo, el nivel de ARNm de un gen "constitutivo" presente en la misma muestra. Un gen "constitutivo" adecuado para su uso como un patrón interno incluye, por ejemplo, miosina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los expertos en la técnica conocen bien métodos para realizar RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa y sus variaciones.

En algunos casos, puede ser deseable determinar simultáneamente el nivel de expresión de una pluralidad de productos génicos de miR diferentes en una muestra. En otros casos, puede ser deseable determinar el nivel de expresión de los transcritos de todos los genes de miR conocidos correlacionados con un cáncer. La evaluación de los niveles de expresión específicos de cáncer para cientos de genes o productos génicos de miR es laboriosa y requiere una gran cantidad de ARN total (por ejemplo al menos 20  $\mu\text{g}$  para cada transferencia de Northern) y técnicas autorradiográficas que requieren isótopos radioactivos.

Para superar estas limitaciones, puede construirse una oligobiblioteca, en formato microplaca (es decir, una micromatriz) que contenga un conjunto de oligonucleótidos (por ejemplo oligodesoxinucleótidos) que sean específicos para un conjunto de genes de miR. Utilizando dicha micromatriz, el nivel de expresión de los microARN múltiples en una muestra biológica puede determinarse por transcripción inversa de los ARN para generar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana e hibridarlos para explorar los oligonucleótidos en la micromatriz para generar un perfil de hibridación, o de expresión. El perfil de hibridación de la muestra de ensayo puede después compararse con el de una muestra control para determinar cuáles son los microARN que tienen un nivel de expresión alterado en células de cáncer de pulmón.

Como se usa en este documento, "oligonucleótido sonda" u "oligodesoxinucleótido sonda" se refiere a un oligonucleótido que puede hibridarse con un oligonucleótido diana. "Oligonucleótido diana" u "oligodesoxinucleótido diana" se refiere a una molécula a detectar (por ejemplo, por hibridación). Por "oligonucleótido sonda específico de miR" u "oligonucleótido sonda específico para un miR" se entiende un oligonucleótido sonda que tiene una secuencia seleccionada que se hibrida con un producto génico de miR, o con un transcrito inverso del producto

génico de miR, específico.

Un "perfil de expresión" o "perfil de hibridación" de una muestra particular es esencialmente una huella del estado de la muestra; aunque cualquier gen particular puede tener dos estados expresados de manera similar, la evaluación de un número de genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión génico que es exclusivo para el estado de la célula. Es decir, el tejido normal puede diferenciarse del tejido canceroso (por ejemplo, tumor), y dentro del tejido canceroso, pueden determinarse diferentes estados de pronóstico (por ejemplo, buenas o malas perspectivas de supervivencia a largo plazo). Comparando perfiles de expresión del tejido canceroso en diferentes estados, se obtiene información con respecto a que genes son importantes (incluyendo la regulación de genes tanto positiva como negativa) en cada uno de estos estados. La identificación de secuencias que se expresan diferencialmente en tejido canceroso, así como la expresión diferencial que da lugar a diferentes resultados de pronóstico, permite el uso de esta información de diversas maneras.

En un ejemplo no limitante, un régimen de tratamiento particular puede evaluarse (por ejemplo, para determinar si un fármaco quimioterapéutico actúa para mejorar el pronóstico a largo plazo en un paciente particular). De manera similar, puede realizarse un diagnóstico o confirmarse comparando muestras de un paciente con perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión génicos (o genes individuales) permiten explorar fármacos candidatos que supriman el perfil de expresión del cáncer de pulmón o conviertan un perfil de mal pronóstico en un perfil de mejor pronóstico.

Por consiguiente, en este documento también se desvelan métodos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer de pulmón, que comprenden realizar la transcripción inversa de ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprenda oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo y comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado de una muestra control o patrón de referencia, en el que una alteración en la señal de al menos un miARN indica que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, cáncer de pulmón.

En una realización, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para una parte sustancial de todos los miARN humanos conocidos. En una realización particular, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en miR29a, miR-29b, miR-29c y combinaciones de los mismos.

La micromatriz puede prepararse a partir de sondas oligonucleotídicas específicas de gen generadas a partir de secuencias de miARN conocidas. La matriz puede contener dos sondas oligonucleotídicas diferentes para cada miARN, conteniendo una la secuencia activa madura y siendo la otra específica para el precursor del miARN. La matriz también puede contener controles, tales como una o más secuencias de ratón que difieren de ortólogos humanos solo en unas pocas bases, que pueden actuar como controles para condiciones de hibridación rigurosas. En la microplaca también pueden imprimirse ARNt y otros ARN (por ejemplo, ARNr, ARNm) de ambas especies, proporcionando un control interno, relativamente estable, positivo para hibridación específica. También puede incluirse uno o más controles apropiados para hibridación no específica en la microplaca. Para este fin, se seleccionan secuencias basándose en la ausencia de cualquier homología con cualquier miARN conocido.

La micromatriz puede fabricarse usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, oligonucleótidos sonda de una longitud apropiada, por ejemplo, 40 nucleótidos, se modifican con 5'-amina en la posición C6 y se imprimen utilizando sistemas de micromatriz disponibles en el comercio, por ejemplo, el Microarrayer GeneMachine OmniGrid™ 100 y portaobjetos activados Amersham CodeLink™. Se prepara oligómero de ADNc marcado correspondiente a los ARN diana por transcripción inversa del ARN diana con cebador marcado. Después de la síntesis de primera cadena, los híbridos de ARN/ADN se desnaturalizan para degradar los moldes de ARN. Los ADNc diana marcados preparados de este modo se hibridan después con la microplaca de micromatriz en condiciones de hibridación, por ejemplo, SSPE 6X/formamida 30 % a 25 °C durante 18 horas, seguido de lavado en TNT (Tris HCl/NaCl/Tween 20) 0,75X a 37 °C durante 40 minutos. La hibridación se produce en posiciones en la matriz en las que el ADN sonda inmovilizado reconoce un ADNc diana complementario en la muestra. El ADNc diana marcado señala la posición exacta en la matriz en la que se produce la unión, permitiendo la detección y cuantificación automática. El resultado consiste en una lista de acontecimientos de hibridación, que indica la abundancia relativa de secuencias de ADNc específicas, y por lo tanto la abundancia relativa de los miR complementarios correspondientes, en la muestra del paciente.

De acuerdo con una realización, el oligómero de ADNc marcado es un ADNc marcado con biotina, preparado a partir de un cebador marcado con biotina. La micromatriz se procesa después por detección directa de los transcritos que contienen biotina utilizando, por ejemplo, conjugado de Estreptavidina-Alexa647, y se explora utilizando procedimientos de exploración convencionales. Las intensidades de imagen de cada punto en la matriz son proporcionales a la abundancia del miR correspondiente en la muestra del paciente.

El uso de la matriz tiene varias ventajas para la detección de la expresión de miARN. En primer lugar, la expresión global de varios cientos de genes puede identificarse en la misma muestra en un punto temporal. En segundo lugar, mediante un diseño cuidadoso de las sondas oligonucleotídicas, puede identificarse la expresión de moléculas tanto maduras como precursoras. En tercer lugar, en comparación con el análisis de transferencia de Northern, la microplaca requiere una cantidad pequeña de ARN, y proporciona resultados reproducibles usando 2,5 µg de ARN total. El número relativamente limitado de miARN (algunos cientos por especie) permite la construcción de una micromatriz común para varias especies, con sondas oligonucleotídicas distintas para cada una. Dicha herramienta posibilita el análisis de expresión entre especies para cada miR conocido en diversas condiciones.

Además de su uso para ensayos de nivel de expresión cuantitativa de miR específicos, puede emplearse una microplaca que contenga oligonucleótidos sonda específicos de miARN correspondientes a una parte sustancial del miRNoma, preferentemente el miRNoma completo, para llevar a cabo el perfil de expresión génica de miR, para análisis de los patrones de expresión de miR. Pueden asociarse firmas de miR distintas con marcadores de enfermedad establecidos, o directamente con una patología.

De acuerdo con los procedimientos de realización de perfiles de expresión descritos en el presente documento, el ARN total de una muestra de un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno particular se transcribe de forma inversa cuantitativamente para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana marcados complementarios del ARN en la muestra. Los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan después con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra. El resultado es un perfil de hibridación para la muestra que representa el patrón de expresión de miARN en la muestra. El perfil de hibridación comprende la señal de la unión de los oligodesoxinucleótidos diana de la muestra con los oligonucleótidos sonda específicos de miARN en la micromatriz. El perfil puede registrarse como la presencia o ausencia de unión (señal frente a señal cero).

Más preferentemente, el perfil registrado incluye la intensidad de la señal de cada hibridación. El perfil se compara con el perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control normal o muestra de referencia. Una alteración en la señal es indicativa de la presencia de, o tendencia a desarrollar, el cáncer en el sujeto.

Otras técnicas para medir la expresión génica de miR también están dentro de la experiencia de la técnica, e incluyen diversas técnicas para medir velocidades de transcripción y degradación de ARN.

En este documento también se desvelan métodos para determinar el pronóstico de un sujeto con un cáncer de pulmón, que comprende medir el nivel de al menos un producto génico de miR, que está asociado con un pronóstico particular en una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón (por ejemplo, un buen pronóstico o pronóstico positivo, o un mal pronóstico o pronóstico adverso), en una muestra de ensayo del sujeto.

De acuerdo con estos métodos, una alteración en el nivel de un producto génico de miR que está asociado con un pronóstico particular en la muestra de ensayo, en comparación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra control, es indicativo de que el sujeto tiene un cáncer de pulmón con un pronóstico particular. En una realización, el producto génico de miR se asocia con un pronóstico adverso (es decir, malo). Como ejemplos de pronósticos adversos se incluyen, pero sin limitación, tasa de supervivencia baja y rápido avance de la enfermedad. En determinadas realizaciones, el nivel de al menos un producto génico de miR se mide por transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridando los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprenda oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo y comparando el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado de una muestra control.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se piensa que las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos de miR pueden dar como resultado la mala regulación de una o más dianas pretendidas para estos miR, lo que puede conducir a la formación de cánceres pulmonares. Por lo tanto, la alteración del nivel del producto génico de miR (por ejemplo, disminuyendo el nivel de un producto génico de miR que esté regulado positivamente en células de cáncer de pulmón, aumentando el nivel de un producto génico de miR que esté regulado negativamente en células cancerosas) puede ser satisfactoria para tratar el cáncer de pulmón.

Por consiguiente, en este documento también se desvelan métodos para inhibir la tumorigénesis en un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene, un cáncer de pulmón, en el que al menos un producto génico de miR está mal regulado (por ejemplo regulado negativamente, regulado positivamente) en las células cancerosas del sujeto. Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado negativamente en las células cancerosas (por ejemplo, familia miR-29), el método comprende administrar una cantidad eficaz de el al menos un producto génico de miR aislado, o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo, de tal manera que en el sujeto se inhiba la proliferación de células cancerosas.

Por ejemplo, cuando un producto génico de miR está regulado negativamente en una célula cancerosa en un sujeto, la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado puede inhibir la proliferación

de la célula cancerosa. El producto génico de miR aislado que se administra al sujeto puede ser idéntico al producto génico de miR de tipo silvestre endógeno (por ejemplo, un producto génico de miR) que está regulado negativamente en la célula cancerosa o puede ser una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo.

5 Como se define en este documento, una “variante” de un producto génico de miR se refiere a un miARN que tiene una identidad menor del 100 % con un producto génico de miR de tipo silvestre correspondiente y que posee una o más actividades biológicas del producto génico de miR del tipo silvestre correspondiente. Como ejemplos de dichas actividades biológicas se incluyen, pero sin limitación, la inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana (por ejemplo, inhibiendo la traducción de una molécula de ARN diana, modulando la estabilidad una molécula de ARN diana, inhibiendo el procesamiento de una molécula de ARN diana) y la inhibición de un proceso celular asociado con cáncer de pulmón (por ejemplo, diferenciación celular, crecimiento celular, muerte celular). Estas variantes incluyen variantes de especies y variantes que son la consecuencia de una o más mutaciones (por ejemplo, una sustitución, una delección, una inserción) en un gen miR. En determinadas realizaciones, la variante tiene una identidad de al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % con un producto génico de miR de tipo silvestre correspondiente.

20 Como se define en este documento, un “fragmento biológicamente activo” de un producto génico de miR se refiere a un fragmento de ARN de un producto génico de miR que posee una o más actividades biológicas de un producto génico de miR de tipo silvestre correspondiente. Como se describe anteriormente, como ejemplos de dichas actividades biológicas se incluyen, pero sin limitación, inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana e inhibición de un proceso celular asociado con un cáncer de pulmón. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo tiene una longitud de al menos aproximadamente 5, 7, 10, 12, 15 o 17 nucleótidos.

25 En una realización particular, un producto génico de miR aislado puede administrarse a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos anticancerosos adicionales. Como tratamientos anticancerosos adecuados se incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de estas (por ejemplo, quimiorradiación).

30 Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado positivamente en las células cancerosas, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto Génico de miR, denominado en este documento compuesto de inhibición de la expresión génica de miR, de tal manera que se inhibe la proliferación de las células cancerosas. En una realización particular, el al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR es un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en la familia miR29, incluyendo miR-29a, miR-29b, miR-29c y combinaciones de estos.

35 Los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento”, como se utilizan en este documento, se refieren a mejorar síntomas asociados con una enfermedad o afección, por ejemplo, un cáncer de pulmón, incluyendo la prevención o retraso de la aparición de los síntomas de la enfermedad y/o disminución de la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad o afección. Los términos “sujeto”, “paciente” e “individuo” se definen en este documento para incluir animales, tales como mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, primates, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones y otras especies de bovinos, ovinos, equinos, caninos, felinos, roedores o especies murinas. En una realización preferida, el animal es un ser humano.

45 Como se usa en este documento, una “cantidad eficaz” de un producto génico de miR aislado es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto que padece un cáncer de pulmón. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un producto génico de miR para administrar a un sujeto determinado, teniendo en cuenta factores tales como, la talla y el peso del sujeto; el grado de penetración de la enfermedad; la edad, salud y sexo del sujeto; la vía de administración; y si la administración es regional o sistémica.

50 Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado puede basarse en el peso aproximado de una masa tumoral a tratar. El peso aproximado de una masa tumoral puede determinarse calculando el volumen de masa apropiado, donde un centímetro cúbico de volumen es casi equivalente a un gramo. Una cantidad eficaz del producto génico de miR aislado basándose en el peso de una masa tumoral puede estar en el intervalo de aproximadamente 10-500 microgramos/gramo de masa tumoral. En determinadas realizaciones, la masa tumoral puede ser al menos aproximadamente 10 microgramos/gramo de masa tumoral, al menos aproximadamente 60 microgramos/gramo de masa tumoral o al menos aproximadamente 100 microgramos/gramo de masa tumoral.

60 Una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado también puede basarse en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto a tratar. Preferentemente, dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o enteral, como se describe en este documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz del producto génico de miR aislado que se administra en un sujeto puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 3000 microgramos/kg de peso corporal, de aproximadamente 700-1000 microgramos/kg de peso corporal, o mayor de aproximadamente 1000 microgramos/kg de peso corporal.

65 Un experto en la técnica también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para la administración de un producto génico de miR aislado a un sujeto determinado. Por ejemplo, un producto génico de

miR puede administrarse al sujeto una vez (por ejemplo, como una sola inyección o deposición). Como alternativa, un producto génico de miR puede administrarse una vez o dos veces al día a un sujeto durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, más particularmente de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación particular, un producto génico de miR se administra una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de administración comprende administraciones múltiples, se entiende que la cantidad eficaz del producto génico de miR administrada a un sujeto puede comprender la cantidad total del producto génico administrado durante todo el régimen de dosificación.

Como se usa en el este documento, un producto génico de miR "aislado" es uno que está sintetizado, o modificado o retirado del estado natural a través de intervención humana. Por ejemplo, un producto génico de miR sintético, o un producto génico de miR parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural, se considera que está "aislado". Un producto génico de miR aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en una célula en la que se ha administrado el producto génico de miR. Por tanto, un producto génico de miR que se administra deliberadamente a una célula, o que se expresa en una célula, se considera que es un producto génico de miR "aislado". Un producto génico de miR producido dentro de una célula de una molécula precursora de miR también se considera que es una molécula "aislada". De acuerdo con una realización particular, los productos génicos de miR aislados descritos en este documento pueden utilizarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer de pulmón en un sujeto (por ejemplo, en un ser humano).

Los productos génicos de miR aislados pueden obtenerse utilizando diversas técnicas convencionales. Por ejemplo, los productos génicos de miR pueden sintetizarse químicamente o producirse de manera recombinante utilizando métodos conocidos en la materia. En una realización, los productos génicos de miR se sintetizan químicamente utilizando ribonucleósidos fosforamiditas protegidos apropiadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Como proveedores comerciales de moléculas de ARN sintético o de reactivos de síntesis se incluyen, por ejemplo, Proligo (Hamburg, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, U.S.A.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, U.S.A.), Glen Research (Sterling, VA, U.S.A.), ChemGenes (Ashland, MA, U.S.A.) y Cruachem (Glasgow, Reino Unido).

Como alternativa, los productos génicos de miR pueden expresarse a partir de plásmidos recombinantes de ADN circular o lineal utilizando cualquier promotor adecuado. Como promotores adecuados para expresar ARN de un plásmido se incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras U6 o H1 de la ARN pol III, o los promotores de citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados se encuentra dentro de la experiencia en la técnica. Los plásmidos recombinantes desvelados en este documento también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos de miR en células cancerosas.

Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes pueden aislarse de sistemas de expresión de células cultivadas por técnicas convencionales. Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes también pueden administrarse a, y expresarse directamente en, las células cancerosas. El uso de plásmidos recombinantes para administrar los productos génicos de miR a células cancerosas se analiza más adelante con más detalle.

Los productos génicos de miR pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante distinto, o pueden expresarse a partir del mismo plásmido recombinante. En una realización, los productos génicos de miR se expresan como moléculas precursoras de ARN a partir de un solo plásmido, y las moléculas precursoras se procesan en el producto génico de miR funcional mediante un sistema de procesamiento adecuado, incluyendo, pero sin limitación, sistemas de procesamiento existentes dentro de una célula cancerosa. Otros sistemas de procesamiento adecuados incluyen, por ejemplo, el sistema de lisados celulares de *Drosophila in vitro* (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2002/0086356 de Tuschl *et al.*) y el sistema RNAsa III de *E. coli* (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2004/0014113 de Yang *et al.*).

La selección de plásmidos adecuados para expresar los productos génicos de miR, métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos en los plásmidos para expresar los productos genicos y métodos para administrar el plásmido recombinante a las células de interés está dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Zeng *et al.* (2002), Molecular Cell 9: 1327-1333; Tuschl (2002), Nat. Biotechnol, 20: 446-448; Brummelkamp *et al.* (2002), Science 296: 550-553; Miyagishi *et al.* (2002), Nat. Biotechnol. 20: 497-500; Paddison *et al.* (2002), Genes Dev. 16: 948-958; Lee *et al.* (2002), Nat. Biotechnol. 20: 500-505; y Paul *et al.* (2002), Nat. Biotechnol. 20: 505-508.

En una realización, un plásmido que expresa los productos génicos de miR comprende una secuencia que codifica un ARN precursor de miR bajo el control del promotor temprano intermedio del CMV. Como se usa en este documento, "bajo el control" de un promotor significa que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el producto génico de miR están localizadas en la posición 3' del promotor, del tal manera que el promotor pueda iniciar la transcripción de las secuencias codificantes del producto génico de miR.

Los productos génicos de miR también pueden expresarse a partir de vectores virales recombinantes. Se contempla que los productos génicos de miR puedan expresarse a partir de dos vectores virales recombinantes distintos, o a

partir del mismo vector viral. El ARN expresado a partir de los vectores virales recombinantes puede aislarse de sistemas de expresión de células cultivadas por técnicas convencionales, o pueden expresarse directamente en células cancerosas. El uso de vectores virales recombinantes para administrar los productos génicos de miR a las células cancerosas se analiza con más detalle más adelante.

5 Los vectores virales recombinantes desvelados en este documento comprenden secuencias que codifican los productos génicos de miR y cualquier promotor adecuado para expresar las secuencias de ARN. Como promotores adecuados se incluyen, pero sin limitación, las secuencias promotoras U6 o H1 de la ARN pol III o los promotores de citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia en la técnica. Los  
10 vectores virales recombinantes descritos en este documento también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos de miR en una célula cancerosa.

15 Puede utilizarse cualquier vector viral que pueda aceptar las secuencias codificantes para los productos génicos de miR; por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), Rabdovirus, virus de la leucemia murina); herpes virus y similares. El tropismo de los vectores virales puede modificarse seudotipificando los vectores con proteínas de envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus o sustituyendo diferentes proteínas de la cápside viral, según sea apropiado.

20 Por ejemplo, como se desvela en este documento, pueden seudotipificarse vectores lentivirales con proteínas de superficie de virus de la estomatitis vesicular (VEV), rabia, Ébola, Mokola y similar. Pueden prepararse vectores de AAV como se describe en este documento para dirigir diferentes células diana modificando por ingeniería genética los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de la cápside. Por ejemplo, un vector de AAV que exprese una cápside de serotipo 2 en un genoma de serotipo 2 se denomina AAV 2/2. Este gen de cápside de serotipo 2 en el vector AAV 2/2 puede reemplazarse por un gen de cápside de serotipo 5 para producir un vector de  
25 AAV 2/5. Las técnicas para construir vectores de AAV que expresen diferentes serotipos de proteínas de cápside se encuentran dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Rabinowitz, J. E., *et al.* (2002), *J. Virol.* 76: 791-801.

30 La selección de vectores virales recombinantes adecuados para su uso como se describe en este documento, los métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar ARN en el vector, los métodos para administrar los vectores virales a las células de interés y recuperar los productos de ARN expresados se encuentran dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg (1995), *Gene Therapy* 2: 301-310; Eglitis (1988), *Biotechniques* 6: 608-614; Miller (1990), *Hum. Gene Therapy* 1: 5-14; y Anderson (1998), *Nature* 392: 25-30.

35 Los vectores virales particularmente adecuados son aquellos derivados de AV y AAV. E Xia *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010 se describe un vector de AV adecuado para expresar los productos génicos de miR, un método para construir el vector de AV recombinante y un método para administrar el vector en células diana. En Samulski *et al.* (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher *et al.* (1996), *J. Virol.*, 70: 520-532; Samulski *et al.* (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.252.479 y 5.139.941 y en las Solicitudes de Patente Internacional Nos WO 94/13788 y WO 93/24641 se describen vectores de AAV adecuados para expresar los  
40 productos génicos de miR, métodos para construir el vector de AAV recombinante y métodos para administrar los vectores en células diana. En una realización, los productos génicos de miR se expresan a partir de un solo vector de AAV recombinante que comprende el promotor temprano intermedio del CMV.

45 En una realización determinada, un vector viral de AAV recombinante como se desvela en este documento comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN precursor de miR unido operativamente a una secuencia de terminación poliT bajo el control de un promotor de ARN U6 humano. Como se usa en este documento, "unido operativamente a una secuencia de terminación poliT" significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas con sentido o antisentido son inmediatamente adyacentes a la señal de  
50 terminación poliT en la dirección 5'. Durante la transcripción de las secuencias miR del vector, las señales de terminación poliT actúan para finalizar la transcripción.

55 En otra realizaciones de los métodos de tratamiento descritos en este documento, al sujeto se le puede administrar una cantidad eficaz de al menos un compuesto que inhiba la expresión de miR. Como se usa en este documento, "inhibir la expresión de miR" significa que la producción del precursor y/o de la forma madura, activa del producto génico de miR después del tratamiento es menor que la cantidad producida antes del tratamiento. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente si la expresión de miR se ha inhibido en una célula cancerosa, utilizando, por ejemplo, las técnicas para determinar el nivel de transcrito de miR descrito anteriormente para el método diagnóstico. La inhibición puede producirse a nivel de expresión génica (es decir, inhibiendo la transcripción de un  
60 gen de miR que codifica el producto génico de miR) o a nivel de procesamiento (por ejemplo, inhibiendo el procesamiento de un precursor de miR en un miR maduro, activo).

65 Como se usa en este documento, una "cantidad eficaz" de un compuesto que inhibe la expresión de miR es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer pulmonar). Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un compuesto de inhibición de la expresión de miR a administrar a un sujeto determinado, teniendo en cuenta factores,

tales como, la talla y peso del sujeto; el grado de penetración de la enfermedad, la edad, salud y sexo del sujeto; la vía de administración, y si la administración es regional o sistémica.

5 Por ejemplo, una cantidad eficaz del compuesto de inhibición de la expresión puede basarse en el peso aproximado de una masa tumoral a tratar, como se describe en este documento. Una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la expresión de miR también puede basarse en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto a tratar, como se describe en este documento.

10 Un experto en la técnica también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para administrar un compuesto que inhiba la expresión de miR en un sujeto determinado.

15 Como compuestos adecuados para inhibir la expresión del gen de miR se incluyen ARN bicatenario (tal como ARN de interferencia corto o pequeño o "ARNip"), ácidos nucleicos antisentido y moléculas de ARN enzimáticas, tales como ribozimas. Cada uno de estos compuestos puede dirigirse a un producto génico de miR determinado e interferir con la expresión (por ejemplo inhibir la traducción, inducir la escisión o destrucción) del producto génico de miR diana.

20 Por ejemplo, la expresión de un gen de miR determinado puede inhibirse induciendo interferencia de ARN del gen de miR con una molécula de ARN bicatenaria ("ARNbc") aislada que tiene una homología de secuencia de al menos 90 %, por ejemplo al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 1,00 % con al menos una parte del producto génico de miR. En una realización particular, la molécula de ARNbc es un "ARN de interferencia corto o pequeño" o "ARNip".

25 El ARNip útil en los métodos presentes comprende ARN bicatenario corto de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El ARNip comprende una cadena de ARN en sentido y una cadena de ARN antisentido complementarias hibridadas entre sí por interacciones entre pares de bases de Watson-Crick convencionales (en este documento, en lo sucesivo "emparejamiento de bases"). La cadena en sentido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos contenida dentro del producto génico de miR diana.

30 Como se usa en este documento, una secuencia de ácido nucleico en un ARNip que es "sustancialmente idéntica" a una secuencia diana contenida dentro del ARNm diana es una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntica a la secuencia diana, o que difiere de la secuencia diana en uno o más nucleótidos. Las cadenas en sentido y antisentido del ARNip pueden comprender dos moléculas de ARN bicatenario complementarias o pueden comprender una sola molécula en la que dos partes complementarias están formando emparejamiento de bases y están unidas covalentemente mediante un área "en horquilla" monocatenaria.

35 El ARNip también puede ser ARN alterado que se diferencia del ARN de origen natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como en la terminación (terminaciones) del ARNip o en uno o más nucleótidos internos del ARNip o modificaciones que hacen que el ARNip sea resistente a digestión por nucleasas o la sustitución en el ARNip de uno o más nucleótidos con desoxirribonucleótidos.

40 Una o ambas cadenas del ARNip también pueden comprender un saliente en la posición 3'. Como se usa en este documento, un "saliente en la posición 3'" se refiere a al menos un nucleótido sin emparejamiento que se extiende desde el extremo 3' de una cadena de ARN dúplex. Por tanto, en determinadas realizaciones, el ARNip comprende al menos un saliente en la posición 3' con una longitud de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos), una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nucleótidos, una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 nucleótidos o una longitud de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos. En una realización particular, el saliente en posición 3' está presente en ambas cadenas del ARNip, y tiene una longitud de dos nucleótidos. Por ejemplo, cada cadena del ARNip puede comprender salientes en posición 3' del ácido ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

45 El ARNip puede producirse química o biológicamente, o puede expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito anteriormente, para los productos génicos de miR aislados. En la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos Nº 2002/0173478 de Gewirtz y en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos Nº 2004/0018176 de Reich *et al* se describen métodos ejemplares para producir y ensayar moléculas de ARNbc o ARNip.

50 La expresión de un gen de miR determinado también puede inhibirse por un ácido nucleico antisentido. Como se usa en este documento, un "ácido nucleico antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une a ARN diana mediante interacciones ARN-ARN, ARN-ADN o ARN-ácido péptido nucleico, que alteran la actividad del ARN diana. Los ácidos nucleicos antisentido adecuados para su uso en los presentes métodos son ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ARN, ADN, quimeras de ARN-ADN, ácido péptido nucleico (APN)) que generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico complementaria a una secuencia de ácido nucleico contigua en un

producto génico de miR. El ácido nucleico antisentido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que sea 50-100 % complementaria, 75-100 % complementaria o 95-100 % complementaria a una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR.

5 Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se piensa que los ácidos nucleicos antisentido activan la RNasa H u otra nucleasa celular que digiere el producto génico de miR/dúplex de ácido nucleico antisentido.

10 Los ácidos nucleicos antisentido también pueden contener modificaciones en la estructura del ácido nucleico o en los restos de azúcares y bases (o sus equivalentes) para potenciar la especificidad diana, la resistencia a nucleasas, la administración u otras propiedades relacionadas con la eficacia de la molécula. Dichas modificaciones incluyen restos de colesterol, intercaladores de dúplex tales como acridina, o uno o más grupos resistentes a nucleasas.

15 Los ácidos nucleicos antisentido pueden producirse química o biológicamente, o pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos de miR aislados. Métodos ejemplares para la producción y ensayo se encuentran dentro de la experiencia en la técnica; véase, por ejemplo, Stein y Cheng (1993), Science 261: 1004 y la Patente de Estados Unidos N° 5.849.902 de Woolf *et al.*

20 La expresión de un gen de miR determinado también puede inhibirla un ácido nucleico enzimático. Como se usa en este documento, un "ácido nucleico enzimático" se refiere a un ácido nucleico que comprende una región de unión a sustrato que tiene complementariedad con una secuencia de ácido nucleico contigua de un producto génico de miR y que puede escindir específicamente el producto génico de miR. La región de unión a sustrato del ácido nucleico enzimático puede ser, por ejemplo 50-100 % complementaria, 75-100 % complementaria o 95-100 % complementaria a una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. Los ácidos nucleicos enzimáticos también pueden comprender modificaciones en los grupos de bases, azúcares y/o fosfato.

25 Como ácidos nucleicos enzimáticos ejemplares para su uso en los presentes métodos se incluyen metiltransferasas *de novo*, incluyendo DNMT3A y DNMT3B como se describe en los Ejemplos de este documento.

30 Los ácidos nucleicos enzimáticos pueden producirse química o biológicamente, o pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante o un vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos de miR aislados. Métodos ejemplares para producir y ensayar moléculas de ARNbc o ARNip se describen en Werner y Uhlenbeck (1995), Nucl. Acids Res. 23: 2092-96; Hammann *et al.* (1999), Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 9: 25-31; y en la Patente de Estados Unidos N° 4.987.071 de Cech *et al.*

35 La administración de al menos un producto génico de miR o de al menos un compuesto para inhibir la expresión de miR inhibirá la proliferación de células cancerosas en un sujeto que tiene un cáncer de pulmón.

40 Como se usa en este documento, "inhibir la proliferación de una célula cancerosa" significa destruir la célula, o detener o reducir permanente o temporalmente el crecimiento de la célula. La inhibición de la proliferación de una célula cancerosa puede inferirse si el número de dichas células en el sujeto permanece constante o disminuye después de la administración de los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión del gen de miR. Una inhibición de la proliferación de células cancerosas también puede inferirse si el número absoluto de dichas células aumenta, pero la tasa de crecimiento tumoral disminuye.

45 El número de células cancerosas en el organismo de un sujeto puede determinarse por medición directa o calculando el tamaño de masas tumorales primarias o metastásicas. Por ejemplo, el número de células cancerosas en un sujeto puede medirse por métodos inmunohistológicos, por citometría de flujo o por otras técnicas diseñadas para detectar marcadores de superficie característicos de células cancerosas.

50 El tamaño de una masa tumoral puede determinarse para observación visual directa o por métodos diagnósticos de obtención de imágenes, tales como rayos X, formación de imágenes por resonancia magnética, ultrasonido y escintigrafía. Los métodos diagnósticos de obtención de imágenes utilizados para determinar el tamaño de la masa tumoral pueden emplearse sin o con agentes de contraste, como se conoce en la materia. El tamaño de una masa tumoral también puede determinarse por medios físicos, tales como palpación de la masa tisular o medición de la masa tisular con un instrumento de medición, tal como un calibrador.

55 Los productos génicos de miR o los compuestos de inhibición de la expresión del gen de miR pueden administrarse a un sujeto mediante cualquiera de los medios adecuados para administrar estos compuestos a las células cancerosas del sujeto. Por ejemplo, los productos génicos de miR o los compuestos de inhibición de expresión de miR pueden administrarse por métodos adecuados para transfectar las células del sujeto con estos compuestos, o con ácidos nucleicos que comprendan las secuencias que codifiquen estos compuestos.

60 En una realización, las células se transfectan con un plásmido o vector viral que comprende las secuencias que codifican al menos un producto génico de miR o un compuesto de inhibición de la expresión del gen de miR.

65

Los métodos de transfección para células eucariotas son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, inyección directa del ácido nucleico en el núcleo o pronúcleo de una célula; electroporación; transferencia de liposomas o transferencia mediada por materiales lipófilos; administración de ácido nucleico mediada por receptores, biobalística o aceleración de partículas; precipitación con fosfato de calcio y transfección mediada por vectores virales.

Por ejemplo, las células pueden transfectarse con un compuesto de transferencia liposomal, por ejemplo, DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio metilsulfato, Boehringer-Mannheim) o un equivalente tal como LIPOFECTIN. La cantidad de ácido nucleico utilizada no es crítica para la realización práctica de la invención; pueden conseguirse resultados aceptables con 0,1-100 microgramos de ácido nucleico/10<sup>5</sup> células. Por ejemplo, puede utilizarse una proporción de aproximadamente 0,5 microgramos de vector plasmídico en 3 microgramos de DOTAP por 10<sup>5</sup> células.

Un producto génico de miR o un compuesto de inhibición de la expresión del gen de miR también puede administrarse a un sujeto mediante cualquier vía de administración enteral o parenteral adecuada. Las vías de administración enteral adecuadas para los presentes métodos incluyen, por ejemplo, administración oral, rectal o intranasal. Las vías de administración parenteral adecuadas incluyen, por ejemplo, administración intravascular (por ejemplo inyección embolada intravenosa, infusión intravenosa, inyección embolada intraarterial, infusión intraarterial, instilación con catéter en la vasculatura); inyección peri e intra-tisular (por ejemplo inyección peri-tumoral e intra-tumoral, inyección intra-retinal o inyección subretinal); inyección o deposición subcutánea, incluyendo infusión subcutánea (tal como mediante bombas osmóticas); aplicación directa en el tejido de interés, por ejemplo, mediante un catéter u otro dispositivo de colocación (por ejemplo, un gránulo retinal o un supositorio o un implante que comprenda un material poroso, no poroso o gelatinoso); e inhalación. Las vías de administración particularmente adecuadas son inyección, infusión e inyección directa en el tumor.

En los métodos presentes, un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión del producto génico de miR puede administrarse al sujeto bien como ARN desnudo, en combinación con un reactivo de administración, o bien como un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido recombinante o un vector viral) que comprenda las secuencias que expresen el producto génico de miR o el compuesto de inhibición de la expresión del producto génico de miR. Como reactivos de administración adecuados se incluyen, por ejemplo, el reactivo lipófilo Transit TKO de Mirus; lipofectina, lipofectamina; celfectina; policationes (por ejemplo, polilisina) y liposomas.

En este documento se exponen y/o son muy conocidos en la materia, plásmidos recombinantes y vectores virales que comprenden secuencias que expresan los productos génicos de miR o los compuestos de inhibición de expresión del gen miR y técnicas para administrar dichos plásmidos y vectores a células cancerosas.

En una realización particular, para administrar a un sujeto un producto génico de miR o un compuesto de inhibición de la expresión del gen miR (o ácidos nucleicos que comprendan secuencias que los codifiquen) se utilizan liposomas. Los liposomas también pueden aumentar la semivida en sangre de los productos génicos o ácidos nucleicos. Liposomas adecuados para su uso como se desvela en este documento pueden formarse a partir de lípidos convencionales formadores de vesículas, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros o cargados negativamente y un esteroles, tal como colesterol. La selección de lípidos está generalmente orientada considerando factores tales como el tamaño deseado del liposoma y la semivida de los liposomas en la corriente sanguínea. Se conocen diversos métodos para preparar liposomas, por ejemplo, como se describe en Szoka *et al.* (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467; y en las Patentes de Estados Unidos Nos 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Los liposomas para utilizar en los presentes métodos pueden comprender una molécula ligando que dirige el liposoma a las células cancerosas. Se prefieren ligandos que se unen a receptores frecuentes en células cancerosas, tales como anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos de células tumorales.

Los liposomas para utilizar en los presentes métodos también pueden modificarse para evitar la eliminación por el sistema mononuclear de macrófagos ("SMM") y sistema retículoendotelial ("SRE"). Dichos liposomas modificados tienen restos de inhibición-opsonización en la superficie o incorporados en la estructura del liposoma. En una realización particularmente preferida, un liposoma puede comprender tanto un resto de inhibición-opsonización como un ligando.

Los restos de inhibición-opsonización para su uso en la preparación de liposomas son normalmente polímeros hidrófilos grandes que están unidos a la membrana del liposoma. Como se usa en este documento, un resto de inhibición-opsonización está "unido" a una membrana del liposoma cuando está química o fisiológicamente adherido a la membrana, por ejemplo, por la intercalación de un anclaje liposoluble en la propia membrana, o por unión directamente a grupos activos de lípidos de membrana.

Estos polímeros hidrófilos de inhibición-opsonización forman una capa superficial protectora que disminuye significativamente la captación de los liposomas por el SMM y SRE; como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.920.016.

Los restos de inhibición-opsonización adecuados para modificar liposomas son preferentemente polímeros hidrosolubles con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 daltons, y más preferentemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 daltons. Dichos polímeros incluyen derivados de polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG); por ejemplo, metoxi PEG o PPG y estearato de PEG o PPG; polímeros sintéticos, tales como poliacrilamida o poli N-vinil pirrolidona; poliamidoaminas lineales, ramificadas o dendríméricas; ácidos poliacrílicos, polialcoholes, por ejemplo, alcohol polivinílico y polixilitol a los que se unen químicamente grupos carboxílicos o amino, así como gangliósidos, tal como gangliósido GM1. También son adecuados copolímeros de PEG, metoxi PEG o metoxi PPG o derivados de los mismos. Además, el polímero de inhibición-opsonización puede ser un copolímero de bloque de PEG y cualquiera de un poliaminoácido, polisacárido, poliamidoamina, polietilenamina o polinucleótido. Los polímeros de inhibición-opsonización también pueden ser polisacáridos naturales que contengan aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péptico, ácido neuramínico, ácido algínico, carragenano, polisacáridos u oligosacáridos aminados (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados que reaccionen, por ejemplo, con derivados de ácidos carbónicos con unión resultante de grupos carboxílicos. Preferentemente, el resto de inhibición-opsonización es un PEG, PPG o un derivado de los mismos. Algunas veces los liposomas modificados con PEG o con derivados de PEG se denominan "liposomas PEGilados".

El resto de inhibición-opsonización puede estar unido a la membrana del liposoma mediante una cualquiera de las numerosas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster N-hidroxi succinimida de PEG puede estar unido a un anclaje liposoluble de fosfatidil etanolamina y después unirse a una membrana. De manera similar, un polímero de dextrano puede derivatizarse con un anclaje liposoluble de estearilamina mediante amidación reductora utilizando  $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$  y una mezcla de disolvente, tal como tetrahidrofurano y agua en una proporción de 30:12 a una temperatura de 60 °C.

Los liposomas modificados con restos de inhibición-opsonización permanecen en la circulación mucho más tiempo que los liposomas no modificados. Por esta razón, algunas veces dichos liposomas se denominan liposomas "sigilosos". Se sabe que los liposomas sigilosos se acumulan en tejidos provistos de microvasculatura porosa o "permeable". Por tanto, tejidos caracterizados por dichos defectos de microvasculatura, por ejemplo, tumores pulmonares, acumularán eficazmente estos liposomas; véase Gabizon, *et al.* (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18: 6949-53. Además, la captación reducida por el SRE (sistema retículoendotelial) disminuye la toxicidad de los liposomas sigilosos impidiendo la acumulación significativa de los liposomas en el hígado y bazo. Por tanto, los liposomas que se modifican con restos de inhibición-opsonización son particularmente adecuados para administrar a células tumorales los productos génicos de miR o los compuestos de inhibición de la expresión del gen de miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican).

Los productos génicos de miR o los compuestos de inhibición de la expresión el gen miR pueden formularse como composiciones farmacéuticas, algunas veces denominadas "medicamentos" antes de administrarlas al sujeto, de acuerdo con técnicas conocidas en la materia. Por consiguiente, en este documento se desvelan composiciones farmacéuticas para el tratamiento de un cáncer de pulmón.

En una realización, la composición farmacéutica comprende al menos un producto génico de miR aislado o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el al menos un producto génico de miR corresponde a un producto génico de miR que tiene un nivel de expresión disminuido en células cancerosas con respecto a células control adecuadas. En determinadas realizaciones, el producto génico de miR aislado se selecciona del grupo que consiste en miR29a, miR-29b, miR-29c y combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR. En una realización particular, el al menos un compuesto de inhibición de la expresión del gen de miR es específico para un gen de miR cuya expresión es mayor en células cancerosas de pulmón que en células control. En determinadas realizaciones, el compuesto de inhibición de la expresión del gen miR es específico para uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR29a, miR-29b, miR-29c y combinaciones de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas como se desvela en este documento se caracterizan por ser al menos estériles y apirógenas. Como se usa en este documento, las "composiciones farmacéuticas" incluyen formulaciones para uso humano o veterinario. Métodos para preparar composiciones farmacéuticas se encuentran en la experiencia en la materia, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Science, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985).

Las presentes composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico de miR o un compuesto de inhibición de la expresión del gen de miR (o al menos un ácido nucleico que comprenda secuencias que los codifique) (por ejemplo, del 0,1 al 90 % en peso), o una sal del mismo fisiológicamente aceptable, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden adicionalmente uno o más agentes anticancerosos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos). Las formulaciones farmacéuticas también pueden comprender al menos un producto génico de miR o un compuesto de

inhibición de la expresión del gen de miR (o al menos un ácido nucleico que comprenda secuencias que los codifique), que están encapsulados por liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende un gen o un producto génico de miR que es uno o más de miR29a, miR-29b y miR-29c.

5 Son vehículos farmacéuticamente aceptables, especialmente adecuados, el agua, el agua tamponada, la solución salina normal, la solución salina al 0,4 %, la glicina al 0,3 %, el ácido hialurónico y similares.

10 En una realización particular, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico de miR o un compuesto de inhibición de la expresión del gen de miR (o al menos un ácido nucleico que comprenda secuencias que los codifique) que es resistente a degradación por nucleasas.

15 Un experto en la materia puede sintetizar fácilmente ácidos nucleicos que sean resistentes a nucleasas, por ejemplo, incorporando en el producto génico de miR uno o más ribonucleótidos que están modificados en la posición 2'. Como ribonucleótidos adecuado, modificados en la posición 2', se incluyen los que están modificados en la posición 2' con flúor, amino, alquilo, alcoxi y O-alilo.

20 Las composiciones farmacéuticas como se desvelan en este documento también pueden comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Como excipientes farmacéuticos adecuados se incluyen estabilizantes, antioxidantes, agentes ajustadores de osmolaridad, tampones y agentes ajustadores del pH. Como aditivos adecuados se incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente compatibles (por ejemplo, clorhidrato de trometamina), adiciones de quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos de quelato de calcio (tal como, por ejemplo, DTPA cálcico, CaNaDTPA-bisamida) u opcionalmente, adiciones de sales de calcio o sodio (por ejemplo, cloruro de calcio, ascorbato de calcio, gluconato de calcio o lactato de calcio). Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse para su uso en forma líquida, o pueden liofilizarse.

30 Para composiciones farmacéuticas sólidas, pueden utilizarse vehículos sólidos, no tóxicos, convencionales farmacéuticamente aceptables; por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

35 Por ejemplo, para administración oral, una composición farmacéutica sólida puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes indicados anteriormente y del 10 al 95%, preferentemente del 25 al 75 % de al menos un producto génico de miR o un compuesto de inhibición de la expresión del gen de miR (o al menos un ácido nucleico que comprenda secuencias que los codifique). Para administración por aerosol (inhalante) una composición farmacéutica puede comprender del 0,01 al 20 % en peso, preferentemente de 1 al 10 % en peso, del al menos un producto del génico de miR o un compuesto de inhibición de la expresión del gen de miR (o al menos un ácido nucleico que comprenda secuencias que los codifique) encapsulado en un liposoma como se ha describe anteriormente, y un propulsor. Si se desea, para administración intranasal también puede incluirse un vehículo; por ejemplo, lecitina.

40 Las composiciones farmacéuticas como las descritas en este documento pueden comprender adicionalmente uno o más agentes anticancerosos. En una realización particular, las composiciones comprenden al menos un producto génico de miR o un compuesto de inhibición de la expresión del gen de miR (o al menos un ácido nucleico que comprenda secuencias que los codifique) y al menos un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que son adecuados para los métodos desvelados en este documento incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes de ADN, agentes antibióticos antitumorales, agentes antimetabólicos, agentes estabilizadores de tubulina, agentes desestabilizadores de tubulina, agentes antagonistas de hormonas, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de proteína quinasas, inhibidores de HMG-CoA, inhibidores de CDK, inhibidores de ciclina, inhibidores de caspasa, inhibidores de metaloproteinasas, ácidos nucleicos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ácidos nucleicos y agentes virales, bacterianos y hexotóxicos modificados molecularmente. Como ejemplos de agentes adecuados para las composiciones desveladas en el este documento se incluyen, pero sin limitación, arabinósido de citidina, metotrexato, vincristina, etopósido (VP-16), doxorubicina (adriamicina), cisplatino (CDDP), dexametasona, arglabina, ciclofosfamida, sarcolisina, metilnitrosourea, fluorouracilo, 5-fluorouracilo (5FU), vinblastina, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, oxaliplatino, irinotecán, topotecán, leucovorina, carmustina, estreptozocina, CPT-11, taxol, tamoxifeno, dacarbacina, rituximab, daunorubicina, 1-β-D-arabinofuranosilcitosina, imatinib, fludarabina, docetaxel, FOLFOX4.

60 En este documento también se desvelan métodos para identificar un inhibidor de tumorigénesis, que comprenden proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR en la célula. En una realización, el método comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión disminuidos en células cancerosas. Un aumento en el nivel del producto génico de miR en la célula después de proporcionar el agente, con respecto a una célula control adecuada (por ejemplo, en la que no se proporciona agente), es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de tumorigénesis. En una realización particular, al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión disminuidos en células cancerosas se selecciona del grupo que consiste en miR29a, miR-29b, miR-29c y combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones el método comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión aumentados en células cancerosas. Una disminución en el nivel del producto génico de miR en la célula después de proporcionar el agente, con respecto a una célula control adecuada (por ejemplo, en la que no se proporciona agente), es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de tumorigénesis. En una realización particular, al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión aumentados en células cancerosas se selecciona del grupo que consiste en miR29a, miR-29b, miR-29c y combinaciones de los mismos.

Como agentes adecuados se incluyen, pero sin limitación, fármacos (por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos) y macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos). El agente puede producirse de manera recombinante, sintética o puede aislarse (es decir, purificarse) de una fuente natural. En la materia se conocen diversos métodos para proporcionar dichos agentes a una célula (por ejemplo, transfección) y varios de dichos métodos se describen anteriormente en este documento. Los métodos para detectar la expresión de al menos un producto génico de miR (por ejemplo transferencia de Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR, perfil de expresión) son muy conocidos en la técnica. Varios de estos métodos también se describen anteriormente en este documento..

La invención se ilustrará ahora a través de los siguientes ejemplos no limitantes.

### EJEMPLO 1

La expresión de miR-29 está inversamente correlacionada con DNMT3A y DNMT3B en pacientes de cáncer de pulmón. Además, los miR-29 se dirigen directamente tanto a DNMT3A como a DNMT3B. La expresión forzada de los miR-29 en líneas celulares de cáncer de pulmón restaura patrones de metilación del ADN normales, induce la reexpresión de genes supresores de tumor (GST) silenciados por metilación, tales como FHIT y WWOX<sup>14</sup> e inhibe la tumorigenicidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

Estos hallazgos confirman una función de los miR-29 en la regulación epigenética del NSCLC, proporcionando un argumento para el desarrollo de estrategias basadas en miR para el tratamiento de cáncer de pulmón.

Se analizaron 172 pares iguales de tejido NSCLC no neoplásico/ primario por análisis inmunohistoquímico de micromatrices tisulares (TMA, *Tissue Microarrays*). Como se muestra en la **Fig. 5**, la expresión más alta de la proteína DNMT3A se asoció significativamente con supervivencia global más baja ( $P=0,029$ ). En esta población de pacientes no se observaron correlaciones estadísticamente significativas con supervivencia para DNMT1 y DNMT3B.

Para validar estas interacciones miARN-diana *in vivo*, se clonaron los sitios complementarios de DNMT3A y DNMT3B en la 3' UTR del gen de luciferasa de luciérnaga y se cotransfectaron con miR-29a, miR-29b o miR-29c en células A459 (NSCLC).

Como se observa en la **Fig. 2a**, los tres miARN (miR-29a, miR-29b o miR-29c) redujeron significativamente la actividad luciferasa con respecto a los oligonucleótidos mezclados. Para evaluar si la expresión ectópica de las secuencias miR-29 individuales inducen la regulación negativa de niveles de ARNm de DNMT3A y DNMT3B endógeno, también se realizó RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) en células derivadas de cáncer de pulmón A549 y H1299, transfectadas con ARN mezclado o con los miR-29.

La sobreexpresión de los miR-29 individuales indujo reducción marcada de niveles de ARNm de DNMT3A y DNMT3B (**Fig. 2b**, superior), mientras que el silenciamiento de los miR-29 con moléculas antisentido, indujo la regulación positiva de niveles de ARNm de DNMT3A y DNMT3B (**Fig. 2b**, inferior) (resultados mostrados solo para células A549).

Para demostrar que la sobreexpresión de los miR-29 podría modular negativamente la expresión de las proteínas DNMT3A y DNMT3B se utilizó un vector indicador de GFP (Proteína Fluorescente Verde), QBI-GFP25.

Resumiendo, las 3'UTR (regiones no traducidas en posición 3') de DNMT3A y DNMT3B se clonaron aguas abajo de la secuencia codificante de GFP del vector QBI-GFP25, lo que permitía la expresión de una proteína de fusión GFP que contenía la 3'UTR de DNMT3A o DNMT3B. Las células A549 se cotransfectaron con el vector GFP-3A/3B-3'UTR más miR-29a, 29b, 29c, u oligonucleótidos mezclados. La reducción marcada en la expresión de la proteína GFP se observó en células transfectadas con los miR-29 (**Fig. 2c**), especialmente la proteína GFP-3B-3'UTR; los resultados de la expresión de la proteína fueron coherentes con los obtenidos por qRT-PCR en los que el ARNm de DNMT3B endógeno era significativamente más reducido por expresión de los miR-29 (**Fig. 2b**).

Aunque sin desear quedar ligado a la teoría, no se cree que la regulación negativa preferencial de DNMT3B en comparación con la de DNMT3A pueda deberse posiblemente a un número global más elevado de "semillas" coincidentes previstas de los miR-29 con 3B 3'-UTR (3 para 29a, 1 para 29b, 1 para 29c) que con 3A 3'-UTR (1 para cada miR-29).

Además, la 3'UTR de DNMT3B presenta sitios coincidentes que difieren en no más de 1 nucleótido para miR-29a y para coincidencias 29b/c. Por lo tanto, la transfección con cualquier miembro de la familia miR-29 puede dar como resultado un silenciamiento más fuerte de DNMT3B que de DNMT3A, de acuerdo con el "principio coordinado" de que los miARN pueden actuar de manera cooperativa a través de sitios diana múltiples en un gen<sup>10,23</sup>.

Para mostrar una interacción funcional, directa de la 3'UTR de DNMT3B con miR-29b, se utilizó un método de detección recientemente descrito para detectar complejos miARN-ARNm en células eucariotas sintetizando ADNc en un molde de ARNm utilizando los miARN como cebadores citoplasmáticos endógenos<sup>24</sup>. El miR-29b endógeno, en el sitio de interacción, previsto de Pictar, con la 3' UTR<sup>8</sup>, puede actuar como un cebador "natural" para iniciar la retrotranscripción del ARNm de DNMT3B (**Fig. 2d**).

Después se determinó si la expresión del ARNm de DNMT3A y DNMT3B se correlacionaba inversamente con los niveles de los miR-29 en tejidos NSCLC primarios. Por cRT-PCR<sup>25</sup> se analizaron catorce (14) NSCLC para determinar los niveles de expresión de los ARNm de DNMT3A y DNMT3B y la expresión de miR-29a, 29b y 29c. Se observó una correlación inversa estadísticamente significativa (**Fig. 6**) entre el ARNm de DNMT3A y el miR-29a (P=0,02) y el miR-29c (P=0,02).

Se observó una correlación inversa similar para los niveles de ARNm de DNMT3B y miR-29a (P=0,02) y miR-29c (P=0,04). Aunque hubo una tendencia hacia una correlación inversa de los niveles de ARNm de DNMT3A y DNMT3B con el nivel de miR-29b, la asociación no fue estadísticamente significativa (DNMT3A P=0,14, DNMT3B P=0,09), esto puede deberse al pequeño número de cánceres analizados o al hecho de que aunque el miR-29a y 29c se transcriben solo a partir de una localización cromosómica, en el cromosoma 7 y 1 respectivamente, el miR-29b maduro se transcribe a partir de dos transcritos primarios diferentes en diferentes cromosomas, el grupo miR-29b-1/miR-29a en 7q32.3 y el grupo miR-29b-2/miR-29c en 1q32.2. La sonda utilizada en la cRT-PCR para determinar el producto maduro de miR-29b no pudo diferenciar entre los productos génicos 29b-1 o 29b-2.

El descubrimiento de que los miR-29 se dirigen a DNMT3A y DNMT3B muestra que la expresión de estos miARN contribuye a las modificaciones epigenéticas del ADN en cáncer. Para abordar esta cuestión, se transfectaron células A549 con miR-29a, miR-29b, miR-29c o con oligonucleótidos mezclados y la metilación de ADN global se analizó 48 y 72 horas después, utilizando un método de LC-MS/MS.<sup>26</sup>

Como se muestra en la **Figura 3a**, los tres miR-29 redujeron la metilación del ADN global con respecto al control. El efecto apareció más fuerte para miR-29b, con una reducción del 30 % después de 48 horas y del 40 % después de 72 horas. El porcentaje de reducción de metilación global observado en las células tratadas con miR-29b es comparable con el observado con inhibidores de DNMT1 tales como decitabina<sup>26</sup>, y es parcial con cualquier estrategia. Aunque sin desear quedar ligados a la teoría, los autores del presente documento piensan ahora que puede conseguirse una hipometilación de ADN global más fuerte que la conseguida combinando decitabina (u otros análogos nucleosídicos) con los miR-29 bloqueando de este modo las rutas de DNMT tanto *de novo* como de mantenimiento.

Para caracterizar efectos de los cambios de metilación sobre la expresión génica, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de dos GST, FHIT y WWOX, que son frecuentemente silenciados por metilación del promotor en cáncer de pulmón<sup>14</sup>.

Como se muestra en la **Figura 3b superior**, 48 horas después de la transfección de células A549, la expresión de FHIT aumentó por expresión de miR-29a, 29b y 29c en ~65 %, 89 % y 74 %, respectivamente, y el nivel de ARNm de WWOX aumentó en ~40 % y 60 % por miR-29a y 29b respectivamente; se observó una tendencia similar en células H1299 (**Fig. 3b, inferior**).

En las dos líneas celulares también se observó expresión aumentada de las dos proteínas FHIT y WWOX (**Fig. 3c**).

Para determinar si los miR-29 regulaban en la expresión de FHIT y WWOX alterando la metilación del promotor de estos genes, se examinó el estado de metilación de la región reguladora de FHIT y WWOX utilizando el sistema MassARRAY<sup>27</sup> (análisis cuantitativo de metilación del ADN a alto rendimiento) en células A549 y H1299 transfectadas con miR-29b. Se diseñaron dos reacciones bisulfito (una para cada isla CpG génica), que incluían 7 CpGs y 11 CpGs para FHIT y WWOX respectivamente. En células H1299 y A549 transfectadas con miR-29b, el análisis MassARRAY para FHIT mostró una reducción promedio del 19,1 % y una metilación del 54,3 %, respectivamente, mientras que para WWOX en H1299 mostró una reducción promedio del 32,1 % en comparación con los oligonucleótidos mezclados (**Fig. 3d**).

También se evaluaron los efectos de re-expresión de los miR-29 sobre la tumorigenicidad de células A549. La expresión ectópica de los miR-29 en células A549 inhibió el crecimiento celular *in vitro* (**Fig. 4a**) e indujo la apoptosis con respecto a la transfección con control mezclado (**Fig. 4b**).

El efecto inhibitorio de los miR-29 sobre la tumorigenicidad de A549 también se observó *in vivo*. La transfección con los miR-29 inhibió el crecimiento de tumores injertados en células A549, con respecto a células transfectadas con

oligonucleótidos control y mezclados (Fig. 4c, 4d, 4e), ilustrando de esta manera un efecto probablemente antineoplásico de estos miARN.

Por lo tanto, este ejemplo muestra que la expresión de los miembros de la familia miR-29 se correlaciona inversamente con la expresión de DNMT3A y DNMT3B en cánceres de pulmón y que estos miARN modulan negativamente niveles de expresión de ambas enzimas.

Además, la expresión forzada de estos miARN en células de cáncer de pulmón conduce a una metilación de ADN global reducida, restaura la expresión de los GST e inhibe la tumorigenicidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados son útiles para desarrollar nuevas terapias epigenéticas utilizando miR-29 sintéticos, solos o en combinación con otros tratamientos, para reactivar supresores tumorales y normalizar patrones de metilación aberrantes en cáncer de pulmón. Dado que la pérdida de expresión de miembros de la familia miR-29 se observa en otras neoplasias malignas humanas comunes, esta estrategia puede extenderse al tratamiento de otras neoplasias malignas humanas.

## MÉTODOS

### Muestras

Se obtuvieron 172 muestras de cáncer de pulmón, incluyendo carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma neuroendocrino de células grandes, denominados en su conjunto carcinomas pulmonares no microcíticos (NSCLC) del Pathology Core Facility de la Universidad del Estado de Ohio para realizar micromatrices (TMA) tisulares para la expresión de las DNMT. Se disponía de las características clínicas (diagnóstico histológico, sexo, edad, estado TNM y tiempo de supervivencia) de estos pacientes.

Se adquirieron tejidos primarios de cáncer de pulmón (8 de carcinoma escamosos y 6 de adenocarcinomas) en el Cooperative Human Tissue Network-Midwestern Division, Columbus, OH, para realizar análisis cRT-PCR. Se aislaron los ARN totales por extracción con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Micromatrices tisulares

Micromatrices tisulares (TMA): cada matriz contenía 4 muestras de cada cáncer de pulmón junto con manchas múltiples de tejido de pulmón y de otros tejidos normales apropiados. Las TMA, normalmente de cada antisuero, se tiñeron con antisueros contra proteínas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B, y la expresión de cada una de estas enzimas en cáncer de pulmón se comparó con características clínicas para averiguar correlaciones significativas. La expresión de las proteínas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B se evaluó en las TMA de cáncer de pulmón, utilizando antisuero de DNMT1 de GeneTex (GTX13537, San Antonio, TX) a una dilución de 1:150; antisuero DNMT3A de Novus Biologicals (ab-4897, Littleton, CO) a una dilución de 1:25 y antisuero de DNMT3B de Abgent (AP1035a, San Diego, CA) a una dilución de 1:32. En un horno a 60 °C se colocaron secciones de 4 micrómetros de bloques de TMA en portaobjetos cargados positivamente, se enfriaron, se desparafinaron y se rehidrataron mediante soluciones de xileno y etanol graduado con agua. Los portaobjetos se desactivaron durante 5 minutos en peróxido de hidrógeno al 3 % para bloquear la peroxidasa endógena. Los antígenos se recuperaron en solución TRS (Dako, Carpintería, CA) a 95 °C, 25 minutos. Los portaobjetos se expusieron a antisueros primarios durante 1 h a temperatura ambiente y a antisueros secundarios (1:200) durante 20 minutos, a temperatura ambiente; los antisueros secundarios eran anti ratón de cabra para DNMT1 y anti conejo de cabra para DNMT3A y DNMT3B. Todos los portaobjetos se bloquearon por biotina endógena antes de la aplicación de los antisueros secundarios marcados con biotina. La detección cromogénica se realizó con Vectastain Elite (Vector, cat N° PK-6100) durante 30 minutos. El sustrato cromogénico fue DAB+ (Dako, cat N° K3468). Los portaobjetos se sometieron a tinción de contraste con hematoxilina, se deshidrataron mediante soluciones de etanol graduado y se cubrieron con cubreobjetos.

Un patólogo que desconocía las características clínicas leyó y puntuó las TMA; las puntuaciones de expresión se determinaron multiplicando el porcentaje de células positivas en una muestra individual por la intensidad de la tinción; la intensidad de la tinción se evaluó en una escala de 1 a 3, donde 1 era la tinción menos intensa y 3 la más intensa. Por ejemplo, a una muestra con un 10% de células positivas con intensidad 3 se le asignó una puntuación de 30, la misma puntuación se asignó a una muestra con un 30% de células positivas con intensidad 1.

**RT-PCR cuantitativa.** Para los miARN se realizó RT-PCR cuantitativa (cRT-PCR) por triplicado con el kit de ensayo MicroARN de TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó ARN 18S para la normalización; se realizaron análisis cRT-PCR para otros genes de interés como se ha descrito previamente<sup>1</sup>. Se realizó la transcripción inversa del ARN a ADNc con cebadores específicos de genes e IQ SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA). La GAPDH sirvió como control de normalización. Para el silenciamiento de los miR-29, se transfectaron células A549 y H1299 en placas de 6 pocillos utilizando reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante, con 100 nM (final) de miR-29a, 29b-1, 29c antisentido o miR antisentido mezclado (Fidelity Systems, Gaithersburg, MD).

**Cultivo celular.** Se mantuvieron células de cáncer de pulmón A549 y H1299 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA) en medio RPMI 1640 con FBS al 10 % y antibióticos (100 U/ml penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina).

5 **Ensayo indicador con luciferasa para dirigir las 3' UTR de DNMT.** Para los experimentos con indicador luciferasa se amplificó un segmento 3'UTR de DNMT3A de 979 pb y un segmento 3'UTR de DNMT3B de 978 pb por PCR a partir de ADN genómico humano y se insertó en el vector de control pGL3 con el promotor SV40 (Promega), utilizando el sitio XbaI inmediatamente aguas arriba del codón de terminación de la luciferasa. Para generar fragmentos específicos se utilizaron los siguientes conjuntos de cebadores:

10 DNMT3A-UTR Dir: 5'-GCTCTA-GAGCCGAAAAGGGTGGACATCAT-3', [SEC ID Nº: 15]

DNMT3A-UTR Inv: 5'-GCTCTAGAGCGCCGAGGGAGTCTCCTTTTA-3'; [SEC ID Nº: 16]

15 DNMT3B-UTR Dir: 5'-GCTCTAGAGCTAGGTAGCAACGTGGCTTTT-3', [SEC ID Nº: 17]

DNMT3B-UTR Inv: 5'-GCTCTA-GAGCGCCCCACAAAACCTGTCAAC-3'. [SEC ID Nº: 18]

20 La 3' UTR amplificada de DNMT3A contiene un sitio de restricción XbaI en la posición 583, por tanto la 3' UTR aguas arriba (DNMT3A 3'-UTRarriba= 583 pb) y el fragmento aguas abajo (DNMT3A 3'-UTRabajo=396 pb) se clonaron por separado en los vectores pGL3. La semilla coincidente predicha de los miR-29 se localizó en el fragmento DNMT3A 3'-UTR cadena abajo, que se utilizó para realizar el ensayo de luciferasa.

25 Las células A549 se cotransfectaron en placas de 12 pocillos utilizando reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante, con 0,4 µg de vector indicador luciferasa de luciérnaga y 0,08 µg de vector control que contenía el vector pRL-TK de luciferasa de Renilla (Promega). Para cada pocillo, se utilizó miR-29a, 29b-1, 29c precursor o miR mezclado (Ambion) 100 nM (final). Las actividades de la luciferasa de luciérnaga y de Renilla se midieron consecutivamente utilizando ensayos de luciferasa doble (Promega), 24 h después de la transfección. Los experimentos se realizaron por triplicado.

30 **Construcciones represoras con GFP para evaluar el efecto de las 3'UTR de DNMT sobre la expresión de proteínas.** Para la represión con GFP, un segmento 3' UTR de DNMT3A de 1472 pb y un segmento 3' UTR de DNMT3B de 1566 pb (correspondiente a la longitud completa de las 3'UTR) se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico humano y se insertaron en el vector QBI-GFP25 (Autofluorescent Proteins, Canadá) utilizando los sitios de clonación BamHI-EcoRI localizados en la posición 3' de la secuencia codificante GFP del vector (que no tiene codón de terminación en el extremo de la secuencia codificante GFP). Para generar fragmentos específicos Se utilizaron los siguientes conjuntos de cebadores:

40 DNMT3A-GFP Dir: 5'-CGGGATCCGCAGGATAGCCAAGTTCAGC-3', [SEC ID Nº: 19]

DNMT3A-GFP Inv: 5'-CCCAAGCTTAAGTGAGAACTGGGCCTGA-3'; [SEC ID Nº: 20]

DNMT3B-GFP Dir: 5'-CGGGATCCCCTCGATCAAACAGGGGAAAA-3', [SEC ID Nº: 21]

45 DNMT3B-GFP Inv: 5'-CCCAAGCTTGTTACGTCTGGCTCCAGTT-3' [SEC ID Nº: 22].

50 Células A549 se cotransfectaron en placas de 12 pocillos utilizando reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante, con 2 µg del vector de expresión GFP que contenía la 3' UTR de DNMT3A (QBI-GFP25-DNMT3A) o la 3' UTR de DNMT3B (QBI-GFP25-DNMT3B) y con 100 nM (final) de miR-29a, 29b-1, 29c precursor u oligonucleótido mezclado (Ambion). Como un control adicional, también se transfectó un grupo de células con el vector GFP (sin miR). Las células se recogieron después de 24 h. La extracción de las proteínas y el análisis de inmunotransferencia se realizaron como se ha descrito anteriormente<sup>2</sup>. Se utilizó el siguiente antisuero primario: anti-GFP policlonal de conejo, 1:1000 (Novus Biologicals, Littleton, CO).

55 **Detección de complejos miR 29b-ARN de DNMT3B.** Para detectar complejos miR-29b-ARN de DNMT3B, se utilizó el método descrito por Vatolin S. *et al.*<sup>3</sup> para determinar si el miR-29b endógeno podía actuar como cebador para la retrotranscripción del ARNm de DNMT3B en células A549. Los ADNc se clonaron en el Vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Se utilizaron los siguientes conjuntos de cebadores y secuencia adaptadora (GSP significa cebador específico de genes, *Gene Specific Primer*):

60 GSP-DNMT3B: 5'-GAGATGACAGGGAAAACTGC-3'; [SEC ID Nº: 23]

GSP-DNMT3B 5N: 5'-ACAGGGAAAACTGCAAAGCT-3'; [SEC ID Nº: 24]

65 Secuencia Adaptadora: 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAA-3'; [SEC ID Nº: 25]

Secuencia Adaptadora 5N: 5'-CTGAAGGAGTAGAAA -3' [SEC ID N°: 26].

Los cebadores 5N representan cebadores anidados de la secuencia adaptadora y GSP utilizados para sensibilizar la detección de bandas PCR.

**Estudios de metilación global.** El estado de metilación global de células A549 después de transfección con miARN mezclado y con los miR-29, se determinó como se ha descrito anteriormente<sup>4</sup>. Para este ensayo, se transfectaron  $2 \times 10^6$  células A549 como se ha descrito anteriormente para el ensayo luciferasa, y se recogieron 48 y 72 horas después.

**Metilación de ADN cuantitativa.** El análisis de metilación de ADN cuantitativa de las regiones reguladoras de FHIT y WWOX se realizó utilizando el ensayo de análisis de metilación EpiTYPER (Sequenom, San Diego, CA). Se diseñaron dos reacciones bisulfito (una para cada isla CpG génica), que incluían 7 CpGs y 11 CpGs para FHIT y WWOX respectivamente. El ADN de células A549/H1299 transfectadas con miR-29b o con mezcla se extrajo 48 horas después de la transfección y 1 µg de ADN se trató con bisulfito, se transcribió *in vitro*, se escindió con Rnasa A y se sometió a análisis de espectrometría de masas de ionización-desorción láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI-TOF) para determinar patrones de metilación, como se ha descrito<sup>5</sup>. Para amplificar las regiones reguladoras de los genes de FHIT y de WWOX se utilizaron los siguientes cebadores:

FHIT Dir: 5'-GGGGAGGTAAGTTTAAGTGGAATATTGTT -3' [SEC ID N°: 27]

FHIT Inv: 5'-CACCCCCAAAACCAAAAACCTATAAC -3' [SEC ID N°: 28]

WWOX Dir: 5'-TTGAAAGAAAGTTTTTTAAAATTAGGAAAT-3' [SEC ID N°: 29]

WWOX Inv: 5'-TCAAAAAACAAAACCTAAAAAAA -3' [SEC ID N°: 30].

Se creó el mapa térmico de la **Figura 3d** utilizando la versión 1.0 del constructor de mapas térmicos de la Universidad de Stanford.

**Análisis de Transferencia de Western para las proteínas FHIT y WWOX.** Se realizó la extracción de proteínas y análisis de inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente<sup>2</sup>. Se utilizaron los siguientes antisueros primarios: anti-FHIT policlonal de conejo, 1:1000 (Zymed, San Francisco, CA); anti-WWOX monoclonal de ratón, 1:500 (como en la ref. 2). La cuantificación de la señal para FHIT, WWOX y Gapdh se realizó utilizando un Densitómetro Personal SI de Molecular Dynamics y el programa informático IMAGEQUANT 5.2 (Image Products International, Chantilly, VA).

**Curva de crecimiento celular.** Las células A549 ( $5 \times 10^4$ ) se sembraron en placas 6x multipocillo y después de 24 horas se transfectaron con oligonucleótidos mezclados u oligonucleótidos miR-29 de Ambion a una concentración final de 100 nM, con Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Como un control también se incluyeron células no transfectadas (control). Las células se recogieron y se contaron a intervalos de 24 horas utilizando un contador ViCell (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Cada muestra se procesó por triplicado.

**Estudios de Apoptosis y de Citometría de Flujo.** Células A549 ( $2 \times 10^5$ ) se transfectaron con oligonucleótidos mezclados u oligonucleótidos miR-29 de Ambion a una concentración final de 100 nM, con Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de 24 horas las células se resuspendieron en tampón de unión que contenía isotiocianato de fluoresceína-anexina V (FITC) y yoduro de propidio de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA) y se evaluaron por citometría de flujo utilizando un citómetro de Beckman-Coulter modelo EPICS XL (Beckman-Coulter). Cada muestra se procesó por triplicado.

**Estudios *In vivo*.** Los estudios con animales se realizaron de acuerdo con directrices institucionales. Células A549 se transfectaron *in vitro* con 100 nM (concentración final) de oligonucleótidos mezclados (Mez) o miR-29a, -29b, o -29c, o se transfectaron de manera simulada utilizando reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. 48 horas después de la transfección, por vía subcutánea se inyectaron  $3 \times 10^6$  células viables en los costados izquierdos de ratones desnudos hembra de 6 semanas de vida (Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, MA), cinco ratones por grupo. 7 días después de la inyección se midieron los diámetros de los tumores y después cada 5 días. 21 días después de la inyección, se sacrificó a los ratones y después de la necropsia los tumores se pesaron. Los volúmenes de los tumores se determinaron utilizando la ecuación  $V$  (en  $\text{mm}^3$ ) =  $A \times B^2/2$ , donde A es el diámetro más grande y B es el diámetro perpendicular.

**Análisis Estadístico.** Se calcularon los valores P bilaterales y se obtuvieron utilizando el paquete informático SPSS (SPSS 10.0). La supervivencia global se calculó a partir del tiempo de diagnóstico hasta la fecha de la última revisión. Los datos se censuraron para pacientes que estaban vivos en el momento de la última revisión. Para realizar el análisis de supervivencia y generar una gráfica de Kaplan-Meier (KM), los niveles de DNMT1, DNMT3A y DNMT3B medidos por tinción inmunohistoquímica se convirtieron en variables distintas dividiendo las muestras en dos clases (alta y baja expresión, de acuerdo con la puntuación DNMT <10 (baja) o >10 (alta)). En cada grupo se

obtuvieron curvas de supervivencia y se compararon utilizando el ensayo de log-rank. Para evaluar la correlación entre la expresión de miARN y DNMT se utilizó análisis de correlación de Pearson y de regresión lineal (paquete informático SPSS). Estas funciones examinan cada par de mediciones (uno del miARN y el otro de las DNMT) para determinar si las dos variables tienden a desplazarse juntas o en dirección opuesta, es decir si los valores más grandes del miARN (expresión alta) están asociados con los valores más bajos de expresión de DNMT.

## EJEMPLO 2

### Métodos, reactivos y kits para el diagnóstico, tinción, pronóstico, monitorización y tratamiento de enfermedades relacionadas con cáncer de pulmón.

Debe entenderse que todos los ejemplos de este documento han de considerarse no limitantes en su alcance. En las siguientes subsecciones se describen diversos aspectos con mayor detalle.

#### Métodos de diagnóstico

En una realización, para evaluar si un paciente tiene una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o tiene un riesgo mayor de lo normal para desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, se desvela un método diagnóstico que comprende las etapas de comparar el nivel de expresión de un marcador en una muestra del paciente con el nivel de expresión normal del marcador en un control, por ejemplo, una muestra de un paciente sin una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Un nivel de expresión del marcador significativamente más alto en la muestra del paciente en comparación con el nivel normal es un indicativo de que el paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o tiene un riesgo mayor de lo normal para desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Los marcadores se seleccionan de tal manera que el valor predictivo positivo de los métodos sea al menos aproximadamente del 10 %, y en determinadas realizaciones no limitantes, aproximadamente del 25 %, aproximadamente del 50 % o aproximadamente del 90 %. Para su uso en los métodos también se prefieren marcadores que se expresen diferencialmente, en comparación con células normales, al menos dos veces en al menos aproximadamente el 20 %, y en determinadas realizaciones no limitantes, aproximadamente el 50 % o aproximadamente el 75 %.

En un método de diagnóstico para evaluar si un paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón (por ejemplo, nueva detección (“exploración”), detección de recurrencia, prueba confirmatoria), el método comprende comparar: a) el nivel de expresión de un marcador en una muestra del paciente, y b) el nivel de expresión normal del marcador en una muestra de enfermedad relacionada con cáncer no pulmonar. Un nivel de expresión del marcador significativamente más alto en la muestra del paciente en comparación con el nivel normal es una indicación de que el paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

También se desvelan métodos de diagnóstico para evaluar la eficacia de una terapia para inhibir en un paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Dichos métodos comprenden comparar: a) la expresión de un marcador en una primera muestra obtenida del paciente antes de proporcionar al menos una parte de la terapia al paciente y b) la expresión del marcador en una segunda muestra obtenida del paciente después de ofrecer parte de la terapia. Un nivel de expresión del marcador significativamente más bajo en la segunda muestra con respecto al de la primera muestra es un indicativo de que la terapia es eficaz para inhibir en el paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Se apreciará que, en estos métodos, la “terapia” puede ser cualquier terapia para el tratamiento de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón incluyendo, pero sin limitación, composiciones farmacéuticas, terapia génica y terapia biológica tal como administrar anticuerpos y quimiocinas. Por tanto, los métodos descritos en este documento pueden utilizarse para evaluar a un paciente antes, durante y después de la terapia, por ejemplo, para evaluar la reducción en patologías.

En determinados aspectos, los métodos del diagnóstico se dirigen a terapias que utilizan un agente químico o biológico. Estos métodos comprenden comparar: a) la expresión de un marcador en una primera muestra obtenida del paciente y conservada en presencia del agente químico o biológico y b) la expresión del marcador en una segunda muestra obtenida del paciente y conservada en ausencia del agente. Un nivel de expresión del marcador significativamente más bajo en la segunda muestra con respecto al de la primera muestra es una indicación de que el agente es eficaz para inhibir en el paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. En otra realización, la primera y segunda muestra pueden ser partes de una sola muestra obtenida del paciente o partes de muestras agrupadas obtenidas del paciente.

**Métodos para evaluar pronósticos**

También se desvela un método de monitorización para evaluar en un paciente la progresión de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, comprendiendo el método: a) detectar en una muestra del paciente, en un primer momento, la expresión de un marcador; b) repetir la etapa a) en un momento posterior en el tiempo; y c) comparar el nivel de expresión detectado en las etapas a) y b) y a partir de esto monitorizar en el paciente la progresión de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Un nivel de expresión del marcador significativamente más alto en la muestra en el momento posterior al de la muestra en el primer momento es un indicativo de que la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón ha progresado, mientras que un nivel de expresión significativamente más bajo es un indicativo de que la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón ha retrocedido.

También se desvela un método de diagnóstico para determinar si una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón ha empeorado o es posible que empeore en el futuro, comprendiendo el método comparar: a) el nivel de expresión de un marcador en una muestra del paciente y b) el nivel de expresión normal del marcador en una muestra control. Un nivel de expresión en la muestra del paciente significativamente más alto en comparación con el nivel normal es un indicativo de que la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón ha empeorado o es posible que empeore en el futuro.

**Métodos para evaluar composiciones inhibitoras, terapéuticas y/o perjudiciales**

También se desvela un método de ensayo para seleccionar una composición para inhibir en un paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Este método comprende las etapas de:

a) obtener una muestra que contenga células del paciente; b) conservar por separado alícuotas de la muestra en presencia de una pluralidad de composiciones de ensayo; c) comparar la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas; y d) seleccionar una de las composiciones de ensayo que reduzca significativamente el nivel de expresión del marcador en la alícuota que contiene esa composición de ensayo, con respecto a los niveles de expresión del marcador en presencia de las restantes composiciones de ensayo.

Adicionalmente se desvela un método de ensayo para evaluar el potencial perjudicial de una composición causando una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Este método comprende las etapas de: a) conservar por separado alícuotas de células en presencia y en ausencia del compuesto y b) comparar la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas. Un nivel de expresión del marcador significativamente más alto en la alícuota conservada en presencia del compuesto, con respecto al de la alícuota conservada en ausencia del compuesto, es un indicativo de que el compuesto posee potencial perjudicial.

Además, también se desvela un método para inhibir en un paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Este método comprende las etapas de: a) obtener una muestra que contenga células del paciente; b) conservar por separado alícuotas de la muestra en presencia de una pluralidad de composiciones; c) comparar la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas; y d) administrar al paciente al menos una de las composiciones que disminuya significativamente el nivel de expresión del marcador en la alícuota que contiene esa composición, con respecto a los niveles de expresión del marcador en presencia de las otras composiciones.

El nivel de expresión de un marcador en una muestra puede evaluarse, por ejemplo, detectando la presencia en la muestra de: la proteína marcadora o un fragmento de la proteína correspondiente (por ejemplo, utilizando un reactivo, tal como un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario, que se une específicamente con la proteína o fragmento de la proteína) el ácido nucleico marcador correspondiente (por ejemplo, un transcrito nucleotídico o un complemento del mismo), o un fragmento del ácido nucleico (por ejemplo poniendo en contacto polinucleótidos transcritos obtenidos de la muestra con un sustrato que tenga fijado al mismo uno o más ácidos nucleicos que tengan toda la secuencia de ácido nucleico o un segmento de la misma, o un complemento de la misma) un metabolito que se produce directamente (es decir catalizado) o indirectamente por la proteína marcadora correspondiente.

Cualquiera de los métodos anteriormente mencionados puede realizarse utilizando al menos uno o una pluralidad (por ejemplo 2, 3, 5 o 10 o más) de marcadores de enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. En dichos métodos, el nivel de expresión en la muestra de cada uno de una pluralidad de marcadores, siendo al menos uno un marcador, se compara con el nivel de expresión normal de cada uno de la pluralidad de marcadores en muestras del mismo tipo obtenida de seres humanos control que no padecen enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Un nivel de expresión significativamente alterado (es decir, aumentado o disminuido como se especifica en los métodos descritos anteriormente utilizando un solo marcador) en la muestra de uno o más marcadores, o alguna combinación de estos, con respecto a los niveles normales o de control correspondientes del marcador, es un indicativo de que el paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Para todos los métodos mencionados anteriormente, el marcador (marcadores) se selecciona de tal manera que el valor predictivo positivo del método sea al menos aproximadamente del 10 %.

### Ejemplos de agentes candidatos

Los agentes candidatos pueden ser agentes farmacológicos ya conocidos en la materia o pueden ser agentes anteriormente desconocidos que tengan cualquier actividad farmacológica. Los agentes pueden surgir de manera natural o diseñarse en el laboratorio. Pueden aislarse de microorganismos animales o plantas, o pueden producirse de manera recombinante, o sintetizarse mediante cualquier método químico adecuado. Pueden ser moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos o peptidomiméticos. En determinadas realizaciones, los agentes candidatos son compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas. Agentes candidatos también se encuentran entre biomoléculas incluyendo, pero sin limitación: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de estos.

Los agentes candidatos se obtienen a partir de diversas fuentes, incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, existen diversos medios disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, pueden producirse fácilmente o se dispone de bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos fúngicos, vegetales y animales. De manera adicional, las bibliotecas y compuestos producidos de manera natural o sintética se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales y pueden utilizarse para producir bibliotecas combinatorias. En determinadas realizaciones, pueden obtenerse agentes candidatos utilizando cualquiera de las numerosas estrategias en la técnica de métodos de bibliotecas combinatorias, incluyendo, como ejemplo no limitante: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase en solución o fase sólida en paralelo espacialmente localizables; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el método de biblioteca de “una perla un compuesto”; y métodos de bibliotecas sintéticas utilizando selección por cromatografía de afinidad.

En determinadas realizaciones adicionales, determinados agentes farmacológicos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales.

También pueden utilizarse los mismos métodos para identificar agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón para validar compuestos/agentes principales generados a partir de estudios realizados *in vitro*.

El agente candidato puede ser un agente que regule positiva o negativamente una o más rutas de respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. En determinadas realizaciones, el agente candidato puede ser un antagonista que afecte a dichas rutas.

### Métodos para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón

En este documento también se desvelan métodos para tratar, inhibir, aliviar o invertir una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. En los métodos descritos en este documento, un agente que interfiere con una cascada de señalización se administra a un individuo que lo necesite, tal como, pero sin limitación, pacientes con una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en quienes dichas complicaciones aún no son evidentes y aquellos que ya tienen al menos una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

En el primer caso, dicho tratamiento es útil para prevenir la aparición de dicha respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de pulmón y/o reducir el grado al cual se produce. En el último caso, dicho tratamiento es útil para reducir el grado al cual se produce dicha respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, prevenir su desarrollo posterior o invertir la respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

En determinadas realizaciones, el agente que interfiere con la cascada de la respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de pulmón puede ser un anticuerpo específico para dicha respuesta.

### Expresión de un marcador

La expresión de un marcador puede inhibirse de diversas maneras, incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, un oligonucleótido antisentido que puede proporcionarse a las células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón para inhibir la transcripción, traducción, o ambas cosas, del marcador (o marcadores). Como alternativa, un polinucleótido que codifique un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se una específicamente con una proteína marcadora, y que se una operativamente con una región promotora/reguladora apropiada, puede proporcionarse a la célula para generar anticuerpos intracelulares que inhibirán la función o actividad de la proteína. La expresión y/o función de un marcador también puede inhibirse tratando la célula enferma relacionada con cáncer de pulmón con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se una específicamente con una proteína marcadora. Utilizando los métodos descritos en este documento, pueden explorarse diversas moléculas, incluyendo particularmente moléculas lo suficientemente pequeñas como para poder

atravesar la membrana celular, para identificar moléculas que inhiban la expresión de un marcador o inhiban la función de una proteína marcadora. El compuesto así identificado puede proporcionarse al paciente para inhibir células enfermas del paciente relacionadas con cáncer de pulmón.

5 En las composiciones, kits y métodos descritos en este documento, puede utilizarse cualquier marcador o combinación de marcadores, así como cualquiera de determinados marcadores en combinación con los marcadores. En general, es deseable utilizar marcadores en los que la diferencia entre el nivel de expresión del marcador en las células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón y el nivel de expresión del mismo marcador en células de pulmón normales sea tan grande como sea posible. Aunque esta diferencia pueda ser tan pequeña como el límite de  
10 detección de método para evaluar la expresión del marcador, es deseable que la diferencia sea al menos mayor que el error típico del método de evaluación, y, en determinadas realizaciones, sea una diferencia de al menos 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 15-, 20-, 100-, 500-, 1000 veces o mayor que el nivel de expresión del mismo marcador en tejidos normales.

15 Se reconoce que determinadas proteínas marcadoras se segreguen al espacio extracelular que rodea las células. Estos marcadores se utilizan en determinadas realizaciones de las composiciones, kits y métodos, debido al hecho de que dichas proteínas marcadoras pueden detectarse en una muestra de fluido corporal asociada con cáncer de pulmón, que puede extraerse más fácilmente de un paciente humano que de una muestra de biopsia tisular. Además, como una técnica realizada *in vivo* para detectar una proteína marcadora se incluye introducir en un sujeto  
20 un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radioactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse por técnicas convencionales de obtención de imágenes.

25 Para determinar si cualquier proteína marcadora particular es una proteína segregada, la proteína marcadora se expresa, por ejemplo, en una célula de mamífero, tal como una línea pulmonar humana, se recoge líquido extracelular y se evalúa la presencia o ausencia de la proteína en el líquido extracelular (por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se una específicamente con la proteína).

30 Se apreciará que, en los métodos descritos en este documento, pueden utilizarse muestras de pacientes que contienen células pulmonares. En estas realizaciones, el nivel de expresión del marcador puede evaluarse evaluando la cantidad (por ejemplo cantidad o concentración absoluta) del marcador en una muestra. La muestra celular puede, por supuesto, someterse a diversas técnicas preparativas y de conservación después de su recogida (por ejemplo extracción, fijación, conservación, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación, etc. de ácidos nucleicos y/o proteínas) antes de evaluar la cantidad de marcador en la muestra.

35 También se apreciará que los marcadores pueden separarse de las células en el sistema digestivo, en la corriente sanguínea y/o en espacios intersticiales. Los marcadores separados pueden analizarse, por ejemplo, examinando el suero o plasma.

40 Las composiciones, kits y métodos pueden utilizarse para detectar la expresión de proteínas marcadoras que tienen al menos una parte que se presenta en la superficie de células que las expresan. Por ejemplo, pueden utilizarse métodos inmunológicos para detectar dichas proteínas en células enteras, o pueden utilizarse métodos de análisis de secuencia basados en ordenador para predecir la presencia de al menos un dominio extracelular (es decir, incluyendo proteínas segregadas y proteínas que tienen al menos un dominio en la superficie celular). La expresión  
45 de una proteína marcadora que tiene al menos una parte que se presenta en la superficie de una célula que la expresa puede detectarse sin realizar necesariamente la lisis de las células (por ejemplo utilizando un anticuerpo marcado que se una específicamente con un dominio de la proteína en la superficie celular).

50 La expresión de un marcador puede evaluarse mediante cualquiera de una amplia diversidad de métodos para detectar la expresión de una proteína o ácido nucleico transcrito. Como ejemplos no limitantes de dichos métodos se incluyen métodos inmunológicos para la detección de proteínas segregadas, de superficie celular, citoplasmáticas o nucleares, métodos de purificación de proteínas, ensayos de función o actividad de proteínas, métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos y métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

55 En una realización particular, la expresión de un marcador se evalúa utilizando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforos, marcado con fluoróforos o marcado con enzimas), un derivado de anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par proteína-ligando), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.), que se una específicamente con una proteína marcadora o fragmento de la misma,  
60 incluyendo una proteína marcadora que ha experimentado toda o a una parte de su modificación postraduccional normal.

65 En otra realización particular, la expresión de un marcador se evalúa preparando ARNm/ADNc (es decir un polinucleótido transcrito) de células en una muestra del paciente, e hibridando el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complemento de un ácido nucleico marcador, o de un fragmento del mismo. Opcionalmente,

el ADNc puede amplificarse utilizando cualquiera de los diversos métodos de reacción en cadena de la polimerasa antes de la hibridación con el polinucleótido de referencia; preferentemente, esto sin amplificar. Asimismo, la expresión de uno o más marcadores puede detectarse utilizando PCR cuantitativa para evaluar el nivel de expresión del marcador (marcadores). Como alternativa, puede utilizarse cualquiera de los muchos métodos de detección de mutaciones o variantes (por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido, deleciones, etc.) de un marcador para detectar la aparición de un marcador en un paciente.

En una realización relacionada, una mezcla de polinucleótidos transcritos obtenidos de la muestra se pone en contacto con un sustrato que tiene fijado al mismo un polinucleótido complementario a u homólogo con al menos una parte (por ejemplo al menos 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500 o más restos de nucleótidos) de un ácido nucleico marcador. Si los polinucleótidos complementarios a u homólogos con son diferencialmente detectables en el sustrato (por ejemplo detectables utilizando diferentes cromóforos o fluoróforos, o fijados en diferentes posiciones seleccionadas), entonces los niveles de expresión de una pluralidad de marcadores pueden evaluarse simultáneamente utilizando un solo sustrato (por ejemplo, una micromatriz de polinucleótidos "gene chip" fijados en posiciones seleccionadas). Cuando se utiliza un método para evaluar la expresión del marcador que implica la hibridación de un ácido nucleico con otro, se desea que la hibridación se realice en condiciones de hibridación rigurosas.

En determinadas realizaciones, los ensayos con biomarcadores pueden realizarse utilizando espectrometría de masas o resonancia de plasmón superficial. En diversas realizaciones, el método para identificar un agente activo contra una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón puede incluir a) proporcionar una muestra de células que contenga uno o más marcadores o derivados de los mismos; b) preparar un extracto de dichas células; c) mezclar dicho extracto con una sonda de ácido nucleico marcada que contenga un sitio de unión al marcador; y d) determinar la formación de un complejo entre el marcador y la sonda de ácido nucleico en presencia o en ausencia del agente de ensayo. La etapa de determinación puede incluir someter dicha mezcla de extracto/sonda de ácido nucleico a un ensayo electroforético de cambio de movilidad.

En determinadas realizaciones, la etapa de determinación comprende un ensayo seleccionado de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos basados en fluorescencia y ensayos de ultra alto rendimiento, por ejemplo resonancia de plasmón superficial (RPS) o ensayos de espectroscopia de correlación de fluorescencia (ECF). En dichas realizaciones, el detector de RPS es útil para la observación directa en tiempo real de interacciones biomoleculares dado que la RPS es sensible a pequeños cambios de índice refractario en una superficie metálica dieléctrica. La RPS es una técnica superficial que es sensible a cambios de unidades de índice refractario (IR) de  $10^5$  a  $10^6$  en aproximadamente 200 nm de la interfaz detector RPS/muestra. Por tanto, la espectroscopia RPS es útil para monitorizar el crecimiento de películas orgánicas finas depositadas en la capa detectora.

Dado que las composiciones, kits y métodos se basan en la detección de una diferencia en niveles de expresión de uno o más marcadores, se desea que el nivel de expresión del marcador sea significativamente más alto que el límite de detección mínimo del método utilizado para evaluar la expresión en al menos una de las células normales y células afectadas por cáncer de pulmón.

Por exploración rutinaria de muestras de pacientes adicionales se entiende que utilizando uno o más de los marcadores, se será consciente que algunos de los marcadores se sobreexpresen en células de diversos tipos, incluyendo enfermedades específicas relacionadas con cáncer de pulmón.

Además, como un gran número de muestras de pacientes se evalúan para la expresión de los marcadores y los resultados de los pacientes individuales de los que se obtienen las muestras están correlacionados, también se confirmará que la expresión alterada de determinados de los marcadores esté fuertemente correlacionada con una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón y que la expresión alterada de otros marcadores esté fuertemente correlacionada con otras enfermedades. Las composiciones, kits y métodos son por tanto útiles para caracterizar en los pacientes uno o más de la fase, grado, tipo histológico y naturaleza de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Cuando las composiciones, kits y métodos se utilizan para caracterizar en un paciente uno o más de la fase, grado, tipo histológico y naturaleza de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, se desea que el marcador o panel de marcadores se seleccione de tal manera que se obtenga un resultado positivo en al menos aproximadamente el 20 % y en determinadas realizaciones, en al menos aproximadamente el 40 %, 60 % u 80 % y sustancialmente en todos los pacientes que padecen una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón de la correspondiente fase, grado, tipo histológico o naturaleza. El marcador o panel de marcadores puede seleccionarse de tal manera que se obtenga un valor predictivo positivo de más de aproximadamente 10 % para la población general (en un ejemplo no limitante, junto con una especificidad de ensayo mayor del 80 %).

Cuando en las composiciones, kits y métodos se utiliza una pluralidad de marcadores, el nivel de expresión de cada marcador en una muestra del paciente puede compararse con el nivel de expresión normal de cada una de la pluralidad de marcadores en muestras de cáncer no pulmonar del mismo tipo, bien en una sola mezcla de reacción

(es decir, utilizando reactivos, tales como sondas fluorescentes diferentes, para cada marcador) o en mezclas de reacción individuales correspondientes a uno o más de los marcadores. En una realización, un nivel de expresión significativamente aumentado de más de uno de la pluralidad de marcadores en la muestra, con respecto a los niveles normales correspondientes, es una indicación de que el paciente padece una enfermedad relacionada con

5

cáncer de pulmón. Cuando se utiliza una pluralidad de marcadores pueden utilizarse 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 20, 30 o 50 o más marcadores individuales; en determinadas realizaciones puede desearse el uso de menos marcadores.

Para maximizar la sensibilidad de las composiciones, kits y métodos (es decir por interferencia atribuible a células de origen no pulmonar en una muestra del paciente) se desea que el marcador utilizado en este sentido sea un

10

marcador que tenga una distribución tisular limitada, por ejemplo, que normalmente no se exprese en un tejido no pulmonar.

Se reconoce que las composiciones, kits y métodos serán de particular utilidad para pacientes que tengan un riesgo potenciado de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón y para sus consultores médicos. Como

15

pacientes que se reconoce que tienen un riesgo potenciado de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón se incluyen, por ejemplo, pacientes que tienen un historial familiar de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

El nivel de expresión de un marcador en tejido pulmonar humano normal puede evaluarse de diversas maneras. En una realización, este nivel de expresión normal se evalúa evaluando el nivel de expresión del marcador en una parte de las células pulmonares que parecen ser normales y comparando este nivel de expresión normal con el nivel de expresión en una parte de las células pulmonares que se sospecha que son anómalas. Como alternativa, y particularmente como información adicional que se vuelve disponible como un resultado de comportamiento rutinario de los métodos descritos en este documento, pueden utilizarse valores promedio de la población para la expresión normal de los marcadores. En otras realizaciones, el nivel de expresión "normal" de un marcador puede determinarse evaluando la expresión del marcador en una muestra del paciente obtenida de un paciente que no padece cáncer de pulmón, de una muestra del paciente obtenida de un paciente antes de la aparición sospechosa de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en el paciente, de muestras de pacientes archivadas, y similar.

20

25

30

En este documento también se desvelan composiciones, kits y métodos para evaluar la presencia de células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón en una muestra (por ejemplo, una muestra tisular archivada o una muestra obtenida de un paciente). Estas composiciones, kits y métodos son sustancialmente iguales a los descritos anteriormente, excepto que, cuando sea necesario, las composiciones, kits y métodos se adaptan para su uso con muestras que no sean muestras de pacientes. Por ejemplo, cuando la muestra a utilizar sea una muestra de tejido humano archivada, parafinada, puede ser necesario ajustar la proporción de compuestos en las composiciones, en los kits o en los métodos utilizados para evaluar los niveles de la expresión del marcador en la muestra.

35

#### **Métodos de producción de anticuerpos**

40

En este documento también se desvela un método para fabricar un hibridoma aislado que produce un anticuerpo útil para evaluar si un paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. En este método, una proteína o péptido que comprende todo o un segmento de una proteína marcadora se sintetiza o se aísla (por ejemplo, por purificación a partir de una célula en la que se expresa o por transcripción y traducción de un ácido nucleico que codifica la proteína o péptido *in vitro* o *in vivo*). Un vertebrado, por ejemplo, un mamífero tal como un ratón, una rata, un conejo o una oveja, se inmuniza utilizando la proteína o el péptido. Opcionalmente (y preferentemente) el vertebrado puede inmunizarse al menos un tiempo adicional con la proteína o péptido, de manera que el vertebrado presente una fuerte respuesta inmunitaria contra la proteína o péptido. Los esplenocitos se aíslan del vertebrado inmunizado y se fusionan con una línea celular inmortalizada para formar hibridomas, utilizando cualquiera de los diversos métodos. Los hibridomas formados de esta manera pueden después explorarse utilizando métodos convencionales para identificar uno o más hibridomas que produzcan un anticuerpo que se una específicamente con la proteína marcadora o un fragmento de la misma. En este documento también se desvelan hibridomas fabricados mediante este método y anticuerpos fabricados utilizando dichos hibridomas.

45

50

#### **Métodos para evaluar la eficacia**

55

En este documento también se desvela un método para evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo para inhibir células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón. Como se describe anteriormente, las diferencias en el nivel de expresión de los marcadores se correlacionan con el estado anómalo de células pulmonares. Aunque se reconoce que los cambios en los niveles de expresión de algunos de los marcadores resulten probablemente del estado anómalo de las células pulmonares, se reconoce igualmente que los cambios en los niveles de expresión de otros de los marcadores inducen, sostienen, y promueven el estado anómalo de las células. Por lo tanto, compuestos que inhiben una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en un paciente harán que el nivel de expresión de uno o más de los marcadores cambie a un nivel más cercano al nivel de expresión normal de ese marcador (es decir, el nivel de expresión para el marcador en células pulmonares normales).

60

65

Por tanto este método comprende comparar la expresión de un marcador en una primera muestra de células pulmonares y conservarlo en presencia del compuesto de ensayo y la expresión del marcador en una segunda muestra de células pulmonares y conservarlo en ausencia del compuesto de ensayo. Una expresión significativamente reducida de un marcador en presencia del compuesto de ensayo es una indicación de que el compuesto de ensayo inhibe una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Las muestras de células pulmonares pueden ser, por ejemplo, alícuotas de una sola muestra de células pulmonares normales obtenidas de un paciente, muestras agrupadas de células pulmonares normales obtenidas de un paciente, células de una línea celular de pulmón normal, alícuotas de una sola muestra de células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón obtenidas de un paciente, muestras agrupadas de células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón obtenidas de un paciente, células de una línea celular de enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, o similar.

En una realización, las muestras son células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón obtenidas de un paciente y se ensaya una pluralidad de compuestos que se piensa que son eficaces para inhibir diversas enfermedades relacionadas con cáncer de pulmón para identificar el compuesto que es posiblemente el mejor para inhibir en el paciente la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Asimismo, este método puede utilizarse para evaluar la eficacia de una terapia para inhibir en un paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. En este método, se evalúa el nivel de expresión de uno o más marcadores en un par de muestras (una sometida a terapia y la otra no sometida a terapia). Al igual que con el método de evaluación de la eficacia de los compuestos, si la terapia induce un nivel de expresión significativamente más bajo de un marcador entonces la terapia es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Como se ha indicado anteriormente, si en este método se utilizan muestras de un paciente seleccionado, entonces pueden evaluarse terapias alternativas *in vitro* para seleccionar una terapia que sea probablemente más eficaz para inhibir en el paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Como se describe en este documento, el estado anómalo de células pulmonares humanas se correlaciona con cambios en los niveles de expresión de los marcadores. También se desvela un método para evaluar el potencial perjudicial de un compuesto de ensayo. Este método comprende conservar por separado alícuotas de células pulmonares humanas en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo. La expresión de un marcador en cada una de las alícuotas se compara. Un nivel de expresión significativamente más alto de un marcador en la alícuota conservada en presencia del compuesto de ensayo (con respecto a la alícuota conservada en ausencia del compuesto de ensayo) es una indicación de que el compuesto de ensayo posee un potencial perjudicial. El potencial perjudicial relativo de diversos compuestos de ensayo puede evaluarse comparando el grado de potenciación o inhibición del nivel de expresión de los marcadores en cuestión, comparando el número de marcadores en los que el nivel de expresión está potenciado o inhibido, o comparando ambas cosas.

### **Proteínas y anticuerpos aislados**

Un aspecto se refiere a proteínas marcadoras aisladas y a partes biológicamente activas de las mismas, así como a fragmentos de polipéptidos adecuados para su uso como inmunógenos para generar anticuerpos dirigidos contra una proteína marcadora o un fragmento de la misma. En una realización, la proteína marcadora nativa puede aislarse de las fuentes de células o tejidos mediante un esquema de purificación apropiado utilizando técnicas de purificación de proteínas convencionales. En otra realización, se produce una proteína o un péptido que comprende todo o un segmento de la proteína marcadora por técnicas de ADN recombinantes. Alternativo a la expresión recombinante, dicha proteína péptido puede sintetizarse químicamente utilizando técnicas de síntesis peptídica convencionales.

Una proteína o parte de la misma biológicamente activa "aislada" o "purificada" carece sustancialmente de material celular o de otras proteínas contaminantes de la fuente de la célula o tejido de la cual deriva la proteína o carece sustancialmente de precursores químicos o de otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "carece sustancialmente de material celular" incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se separa de componentes celulares de las células de las que se aíslan o se producen de manera recombinante. Por tanto, la proteína que carece sustancialmente de material celular incluye preparaciones de proteínas que tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en este documento "proteína contaminante").

Cuando la proteína o parte de la misma biológicamente activa se produce de manera recombinante, preferentemente también carece sustancialmente de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de la proteína. Cuando la proteína se produce mediante síntesis química, preferentemente carece sustancialmente de precursores químicos o de otros productos químicos, es decir, se separa de precursores químicos o de otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente dichas preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del polipéptido de interés.

Las partes biológicamente activas de una proteína marcadora incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora, que incluye menos aminoácidos que la proteína de longitud completa y presentan al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Normalmente, las partes biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Una parte biológicamente activa de una proteína marcadora puede ser un polipéptido que tenga una longitud de, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos. Además, mediante técnicas recombinantes pueden prepararse otras partes biológicamente activas, en las que otras regiones de la proteína marcadora estén deletionadas, y evaluar una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de la proteína marcadora. En determinadas realizaciones, proteínas útiles son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos aproximadamente 40 %, y en determinadas realizaciones, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %) a una de estas secuencias y conservan la actividad funcional de la proteína marcadora correspondiente de origen natural incluso difiere en la secuencia de aminoácidos debido a una variación alélica natural o a mutagénesis.

Además, pueden utilizarse bibliotecas de segmentos de una proteína marcadora para generar una población heterogénea de polipéptidos para explorar y posteriormente seleccionar proteínas marcadoras variantes o segmentos de las mismas.

#### Medicina predictiva

En el presente documento también se desvelan usos de modelos animales y marcadores en el campo de la medicina predictiva, en la que se utilizan ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, farmacogenómica y ensayos clínicos de monitorización con fines de pronóstico (predictivos) para tratar de este modo a un individuo de manera profiláctica. Por consiguiente, en este documento también se desvelan ensayos de diagnóstico para determinar el nivel de expresión de una o más proteínas marcadoras o ácidos nucleicos marcadores para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Dichos ensayos pueden utilizarse con fines de pronóstico o predictivos para tratar de este modo a un individuo de manera profiláctica antes de la aparición de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

En otro aspecto, los métodos son útiles para explorar al menos periódicamente al mismo individuo para observar si ese individuo se ha expuesto a productos químicos o a toxinas que cambian sus patrones de expresión.

Otros aspecto adicional se relaciona con la monitorización de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos u otros compuestos administrados para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o para tratar o prevenir cualquier otro trastorno (por ejemplo para entender cualquier efecto del sistema que dicho tratamiento pueda tener) sobre la expresión o actividad de un marcador en ensayos clínicos.

#### Farmacogenómica

Los marcadores también son útiles como marcadores farmacogenómicos. Como se utiliza en este documento, un "marcador farmacogenómico" es un marcador bioquímico objetivo cuyo nivel de expresión se correlaciona con una respuesta farmacológica clínica o susceptibilidad específica en un paciente. La presencia o cantidad de la expresión del marcador farmacogenómico se relaciona con la respuesta esperada del paciente y más particularmente con el tumor del paciente para terapia con un fármaco o clases de fármacos específicos. Evaluando la presencia o cantidad de la expresión de uno o más marcadores farmacogenómicos en un paciente, puede seleccionarse una terapia farmacológica que sea más apropiada para el paciente, o que se espera que tenga un mayor grado de éxito.

#### Monitorización de Estudios Clínicos

La monitorización de la influencia de agentes (por ejemplo, compuestos farmacológicos) sobre el nivel de expresión de un marcador puede aplicarse no solo en exploración farmacológica básica, sino también en estudios clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente para influir en la expresión de un marcador puede monitorizarse en estudios clínicos de sujetos que reciben tratamiento para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

En una realización no limitante, en este documento se desvela un método para monitorizar la eficacia de tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro candidato farmacológico) que comprende las etapas de (i) obtener una muestra de pre-administración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de uno o más marcadores seleccionados en la muestra de pre-administración; (iii) obtener una o más muestras de post-administración del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión del marcador (o marcadores) en las muestras de post-administración; (v) comparar el nivel de expresión del marcador (o marcadores) en la muestra de pre-administración con el nivel de expresión del marcador (o marcadores) en la muestra o muestras de post-administración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto de manera consecuyente.

Por ejemplo, la expresión aumentada del gen (o genes) marcador durante el ciclo del tratamiento puede indicar dosificación ineficaz y la conveniencia de aumentar la dosificación. Por el contrario, la expresión disminuida del gen

(o genes) marcador puede indicar tratamiento eficaz y no requiere el cambio de dosificación.

**Medios legibles por aparatos electrónicos, sistemas, matrices y métodos de usos de los mismos**

5 Como se utiliza en este documento, “medios legibles por aparatos electrónicos” se refiere a cualquier medio adecuado para almacenar, guardar o contener datos o información que pueda leerse y a la cual pueda accederse directamente a través de un aparato electrónico. Dichos medios pueden incluir, pero sin limitación: medios de almacenamiento magnético, tales como disquetes, medios de almacenamiento en disco duro, y cintas magnéticas; medios de almacenamiento óptico tales como discos compactos; medios de almacenamiento electrónico tales como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares; y discos duros comunes e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnético/óptico. El medio se adapta o se configura para tener registrado en su interior un marcador como se describe en este documento.

15 Como se utiliza en este documento, la expresión “aparato electrónico” pretende incluir cualquier aparato de ordenador o procesador adecuado u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos e información. Como ejemplos de aparatos electrónicos adecuados para su uso como se desvela en este documento se incluyen aparatos informáticos autónomos; sistemas de redes, incluyendo un sistema de red de área local (LAN), un sistema de red de banda ancha (WAN), Internet, Intranet y Extranet; dispositivos electrónicos tales como agendas electrónicas (PDA, *personal digital assistants*), un teléfono móvil, un paginador y similar; y sistemas de procesamiento local y distribuido.

20 Como se utiliza en este documento, “registrado” se refiere a un proceso para almacenar o codificar información en un medio legible por un aparato electrónico. Los expertos en la materia pueden adoptar fácilmente cualquier método para registrar información en medios para generar materiales que comprendan los marcadores descritos en este documento.

25 Pueden utilizarse diversos programas informáticos y formatos para almacenar la información del marcador desvelada en este documento en el medio legible por el aparato electrónico. Puede emplearse cualquier cantidad de formatos de estructuración de procesadores de datos (por ejemplo, archivos de texto o bases de datos) para obtener o crear un medio que tenga registrado en el mismo los marcadores. Proporcionando los marcadores en forma legible, puede accederse rutinariamente a la información de secuencias del marcador para diversos propósitos. Por ejemplo, un experto en la materia puede utilizar las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos en forma legible para comparar una secuencia diana o motivo estructural diana con la información de secuencias almacenada en el medio de almacenamiento de datos. Los medios de búsqueda se utilizan para identificar fragmentos o regiones de las secuencias que coinciden con una secuencia o un motivo diana particular.

30 Por tanto, en este documento también se desvela un medio para guardar instrucciones para realizar un método para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o una predisposición a una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, donde el método comprende las etapas de determinar la presencia o ausencia de un marcador y basándose en la presencia o ausencia del marcador, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o una predisposición a tener una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón y/o recomendar un tratamiento particular para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o una predisposición a tener una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

35 En este documento también se desvela un sistema electrónico y/o de redes, un método para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o una predisposición a tener una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón asociada con un marcador donde el método comprende las etapas de determinar la presencia o ausencia del marcador, y basándose en la presencia o ausencia del marcador, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o una predisposición a tener una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón y/o recomendar un tratamiento particular para la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o predisposición a tener una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. El método puede comprender adicionalmente la etapa de recibir información fenotípica asociada con el sujeto y/o adquirir información fenotípica asociada con el sujeto de un sistema de redes.

40 En este documento también se desvela un sistema de redes, un método para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con un cáncer de pulmón o una predisposición a tener una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón asociada con un marcador, comprendiendo el método las etapas de recibir información asociada con el marcador, recibir información fenotípica asociada con el sujeto, adquirir información de la red correspondiente con el marcador y/o una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, y basándose en una o más de las informaciones fenotípicas, el marcador y la información adquirida, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o una predisposición a tener una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. El método puede comprender adicionalmente la etapa de recomendar un tratamiento particular para la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o una predisposición a tener una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

45 En este documento también se desvela un método de trabajo para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o una predisposición a una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón,

comprendiendo el método las etapas de recibir información asociada con el marcador, recibir información fenotípica asociada con el sujeto, adquirir información de la red correspondiente con el marcador y/o una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón y basándose en una o más de las informaciones fenotípicas, el marcador y la información adquirida, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o una predisposición a tener una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. El método puede comprender adicionalmente la etapa de recomendar un tratamiento particular para la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón o predisposición a tener una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

En este documento también se desvela una matriz que puede utilizarse para ensayar la expresión de uno o más genes en la matriz. En una realización, la matriz puede utilizarse para ensayar la expresión génica en un tejido para determinar la especificidad tisular de genes en la matriz. De esta manera, puede ensayarse simultáneamente la expresión de hasta aproximadamente 7000 genes o más. Esto permite desarrollar un perfil que muestre una batería de genes específicamente expresados en uno o más tejidos.

Además de dicha determinación cualitativa, en este documento se desvela la cuantificación de la expresión génica. Por tanto, no solamente puede determinarse la especificidad tisular, sino también el nivel de expresión de una batería de genes en el tejido. Por tanto, los genes pueden agruparse basándose en su expresión tisular de por sí y en el nivel de expresión en ese tejido. Esto es útil, por ejemplo, en la determinación de la relación de la expresión génica entre o en medio de tejidos. Por tanto, un tejido puede alterarse y el efecto sobre la expresión génica en un segundo tejido puede determinarse. En este contexto, puede determinarse el efecto de un tipo de célula sobre otro tipo de célula en respuesta a un estímulo biológico.

Dicha determinación es útil, por ejemplo, para conocer el efecto de la interacción célula-célula a nivel de expresión génica. Si un agente se administra terapéuticamente para tratar un tipo de célula pero tiene un efecto no deseable en otro tipo de célula, el método proporciona un ensayo para determinar la base molecular del efecto no deseable y por tanto proporciona la oportunidad de coadministrar un agente que contrarreste o trate de otra manera el efecto no deseado. De manera similar, incluso en un solo tipo de célula, los efectos biológicos no deseables pueden determinarse a nivel molecular. Por tanto, los efectos de un agente sobre la expresión de otro distinto del gen diana pueden determinarse y contrarrestarse.

En otra realización, la matriz puede utilizarse para monitorizar la evolución de la expresión de uno o más genes en la matriz. Esto puede ocurrir en diversos contextos biológicos, como se desvela en este documento, por ejemplo, en el desarrollo de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, progresión de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón y procesos, tales como transformación celular asociada con una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

La matriz es también útil para determinar el efecto de la expresión de un gen o la expresión de otros genes en la misma célula o en células diferentes. Esto proporciona, por ejemplo, una selección de dianas moleculares alternativas para intervención terapéutica si la diana final o cadena abajo no está regulada.

La matriz es también útil para determinar patrones de expresión diferencial de uno o más genes en células normales y anómalas. Esto proporciona una batería de genes que podría servir como una diana molecular para el diagnóstico o intervención terapéutica.

#### **Marcadores Indirectos**

Los marcadores pueden servir como marcadores indirectos para uno o más trastornos o patologías o para afecciones que conducen a una patología relacionada con un cáncer de pulmón. Como se utiliza en este documento, un "marcador indirecto" es un marcador bioquímico objetivo que se correlaciona con la ausencia o presencia de una enfermedad o trastorno, o con la progresión de una enfermedad o trastorno. La presencia o cantidad de dichos marcadores es independiente de la enfermedad. Por lo tanto, estos marcadores pueden servir para indicar si un ciclo de tratamiento particular es eficaz en la disminución de una patología o trastorno. Los marcadores indirectos son de uso particular cuando la presencia o grado de una patología o trastorno es difícil de evaluar a través de metodologías convencionales, o cuando se desea realizar una evaluación de la progresión de la enfermedad antes de obtener un criterio de valoración final clínico potencialmente peligroso.

Los marcadores son también útiles como marcadores farmacodinámicos. Como se utiliza en este documento, un "marcador farmacodinámico" es un marcador bioquímico objetivo que se correlaciona específicamente con efectos farmacológicos. La presencia o cantidad de un marcador farmacodinámico no está relacionada con la patología o trastorno para el que se está administrando el fármaco; por lo tanto, la presencia o cantidad del marcador es indicativa de la presencia o actividad del fármaco en un sujeto. Por ejemplo, un marcador farmacodinámico puede ser indicativo de la concentración del fármaco en un tejido biológico, ya que el marcador se expresa o se transcribe o no se expresa o no se transcribe en ese tejido en relación con el nivel del fármaco. De esta manera, el marcador farmacodinámico puede monitorizar la distribución o captación del fármaco. De manera similar, la presencia o cantidad del marcador farmacodinámico puede regularse con la presencia o cantidad del producto metabólico de un fármaco, de tal manera que la presencia o cantidad del marcador es indicativa de la tasa de degradación relativa del

fármaco *in vivo*.

Los marcadores farmacodinámicos son de uso particular aumentando la sensibilidad de detección de efectos farmacológicos, particularmente cuando el fármaco se administra a dosis bajas. Dado que incluso una pequeña cantidad de un fármaco puede ser suficiente para activar rondas múltiples de transcripción o expresión del marcador, el marcador amplificado puede estar en una cantidad que sea más fácilmente detectable que el propio fármaco. Además, el marcador puede detectarse más fácilmente debido a la naturaleza del propio marcador; por ejemplo, utilizando los métodos descritos en este documento, pueden emplearse anticuerpos en un sistema de detección basado en el sistema inmunológico para un marcador de proteína o pueden utilizarse sondas radiomarcadas específicas de marcadores para detectar un marcador de ARNm. Adicionalmente, el uso de un marcador farmacodinámico puede ofrecer predicción de riesgo basada en mecanismos debido al tratamiento farmacológico más allá del intervalo de observaciones directas posibles.

### Protocolos de Ensayo

El método de ensayo para enfermedades relacionadas con cáncer de pulmón comprende, por ejemplo, medir el nivel de expresión de cada gen marcador en una muestra biológica de un sujeto a lo largo del tiempo y comparar el nivel con el del gen marcador en una muestra biológica control.

Cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en este documento y el nivel de expresión se expresa diferencialmente (por ejemplo, es mayor o menor que el del control), se considera que el sujeto padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Cuando el nivel de expresión del gen marcador se encuentra dentro del intervalo permisible, es poco probable que el sujeto padezca una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

El valor patrón para el control puede determinarse midiendo el nivel de expresión del gen marcador en el control, para comparar los niveles de expresión. Por ejemplo, el valor patrón puede determinarse basándose en el nivel de expresión del gen marcador anteriormente mencionado en el control. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el intervalo permisible se toma como  $\pm 2$  D.T. basándose en el valor patrón. Una vez determinado el valor patrón, el método de ensayo puede realizarse midiendo solamente el nivel de expresión en una muestra biológica de un sujeto y comparando el valor con el valor patrón determinado para el control.

Los niveles de expresión de genes marcadores incluyen la transcripción de los genes marcadores a ARNm y la traducción en proteínas. Por lo tanto, un método para ensayar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón se realiza basándose en una comparación de la intensidad de la expresión de ARNm correspondiente con los genes marcadores, o del nivel de expresión de proteínas codificadas por los genes marcadores.

La medición de los niveles de expresión de genes marcadores en el ensayo para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón puede realizarse de acuerdo con diversos métodos de análisis de genes. Específicamente, puede utilizarse, por ejemplo, una técnica de hibridación utilizando como sondas ácidos nucleicos que se hibriden con esos genes, o una técnica de amplificación de genes utilizando como cebador ADN que se hibride con los genes marcadores.

Las sondas de cebadores utilizados para el ensayo pueden diseñarse basándose en las secuencias de nucleótidos de los genes marcadores. En este documento se describen los números de identificación de las secuencias de nucleótidos de los genes marcadores respectivos.

Además, debe entenderse que los genes de animales superiores generalmente vienen acompañados de polimorfismo en una alta frecuencia. También hay muchas moléculas que producen isoformas que comprenden secuencias de aminoácidos mutuamente diferentes durante el proceso de corte y empalme. Cualquier gen asociado con una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón que tenga una actividad similar a la un gen marcador se incluye en los genes marcadores, incluso si tiene diferencias en la secuencia de nucleótidos debido al polimorfismo o si es una isoforma.

También debe entenderse que los genes marcadores pueden incluir homólogos de otras especies además de la humana. Por tanto, al menos que se especifique otra cosa, la expresión del "gen marcador" se refiere a un homólogo del gen marcador único para la especie o un gen marcador extraño que se ha introducido en un individuo.

Además, también debe entenderse que un "homólogo de un gen marcador" se refiere a un derivado génico de una especie distinta de la humana, que puede hibridarse con el gen marcador humano como una sonda en condiciones rigurosas. Dichas condiciones rigurosas son conocidas por un experto en la materia que pueda seleccionar una condición apropiada para producir una rigurosidad experimental o empíricamente igual.

Un polinucleótido que comprenda la secuencia de nucleótidos de un gen marcador o una secuencia de nucleótidos que sea complementaria de la cadena complementaria de la secuencia de nucleótidos de un gen marcador y que tenga al menos 15 nucleótidos puede utilizarse como cebador o sonda. Por tanto, una "cadena complementaria" significa una cadena de un ADN bicatenario con respecto a otra cadena y que está formada por pares de bases A:T

(U para ARN) y G:C.

Además, "complementario" significa no solo aquellos que son completamente complementarios con una región de al menos 15 nucleótidos continuos, sino también aquellos que tienen una homología de secuencia de nucleótidos de al menos 40 % en algunos casos, 50 % en algunos casos, 60 % en algunos, 70 % en algunos casos, al menos 80 %, 90 % y 95 % o más. El grado de homología entre secuencias de nucleótidos puede determinarse mediante un algoritmo, BLAST, etc.

Dichos polinucleótidos son útiles como una sonda para detectar un gen marcador, o como un cebador para amplificar un gen marcador. Cuando se utiliza como un cebador, el polinucleótido comprende normalmente de 15 pb a 100 pb y en determinadas realizaciones de 15 pb a 35 pb de nucleótidos. Cuando se utiliza como una sonda, un ADN comprende toda la secuencia de nucleótidos del gen marcador (o la cadena complementaria del mismo), o una secuencia parcial del mismo que tiene al menos 15 pb de nucleótidos. Cuando se utiliza como un cebador, la región 3' debe ser complementaria con el gen marcador, mientras que la región 5' puede unirse a una secuencia o etiqueta de reconocimiento de enzimas de restricción.

Los "polinucleótidos" pueden ser de ADN o ARN. Estos polinucleótidos pueden ser sintéticos o naturales. Además el ADN utilizado como una sonda para la hibridación está normalmente marcado. Los expertos en la materia entienden fácilmente dichos métodos de marcaje. En este documento, el término "oligonucleótido" significa un polinucleótido con un grado de polimerización relativamente bajo. Los oligonucleótidos incluyen en polinucleótidos.

Pueden realizarse ensayos para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón utilizando técnicas de hibridación, utilizando, por ejemplo, hibridación de Northern, hibridación de transferencia puntual o la técnica de micromatriz de ADN. Además, pueden utilizarse técnicas de amplificación génica, tales como el método RT-PCR. Utilizando el método de monitorización de amplificación por PCR durante la etapa de amplificación génica en RT-PCR, pueden conseguirse uno o más análisis cuantitativos para la expresión de un gen marcador.

En el método de monitorización de amplificación génica por PCR, la diana de detección (ADN o transcrito inverso de ARN) se hibrida con sondas que están marcadas con un colorante fluorescente y un desactivador que absorbe la fluorescencia. Cuando la PCR prosigue y la Taq polimerasa degrada la sonda con su actividad 5'-3' exonucleasa, el colorante fluorescente y el desactivador se alejan entre sí y se detecta la fluorescencia. La fluorescencia se detecta en tiempo real. Midiendo simultáneamente una muestra patrón en la que se conoce el número de copias de una diana, es posible determinar el número de copias de la diana en la muestra de un sujeto con el número de ciclos en el que la amplificación PCR es lineal. Además, un experto en la materia reconoce que el método de monitorización de amplificación por PCR puede realizarse utilizando cualquier método adecuado.

El método de ensayo para detectar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón también puede realizarse detectando una proteína codificada por un gen marcador. En lo sucesivo en este documento, una proteína codificada por un gen marcador se describe como una "proteína marcadora". Para dichos métodos de ensayo puede emplearse, por ejemplo, el método de transferencia de Western, el método de inmunoprecipitación y el método ELISA utilizando un anticuerpo que se una a cada proteína marcadora.

Los anticuerpos utilizados en la detección que se unen a la proteína marcadora pueden introducirse mediante cualquier técnica adecuada. Además, para detectar una proteína marcadora, dicho anticuerpo puede marcarse apropiadamente. Como alternativa, en lugar de marcar el anticuerpo, puede marcarse una sustancia que se una específicamente al anticuerpo, por ejemplo, la proteína A o proteína G para detectar la proteína marcadora indirectamente. Más específicamente, dicho método de detección puede incluir el método ELISA.

Puede obtenerse una proteína o un péptido parcial de la misma utilizado como un antígeno, por ejemplo, insertando un gen marcador o una parte del mismo en un vector de expresión, introduciendo la construcción en una célula hospedadora apropiada para producir un transformante, cultivar el transformante para expresar la proteína recombinante, y purificar la proteína recombinante expresada del cultivo o del sobrenadante de cultivo. Como alternativa, la secuencia de aminoácidos codificada por un gen o un oligopéptido que comprende una parte de la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc de longitud completa se sintetiza químicamente para utilizarse como un inmunógeno.

Además, puede realizarse un ensayo para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón utilizando como un índice no solo el nivel de expresión de un gen marcador sino también la actividad de una proteína marcadora en una muestra biológica. La actividad de una proteína marcadora significa la actividad biológica intrínseca para la proteína. Para medir la actividad de cada proteína pueden utilizarse diversos métodos.

Incluso si un paciente no está diagnosticado como que padece una enfermedad relacionada con un cáncer de pulmón en un ensayo rutinario a pesar de los síntomas que sugieren estas enfermedades, realizando un ensayo de acuerdo con los métodos descritos en este documento puede determinarse fácilmente si un paciente padece o no una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Más específicamente, en determinadas realizaciones, cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en este documento, un aumento o disminución en el nivel de expresión del gen marcador en un paciente cuyos síntomas sugieren al menos una susceptibilidad a una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón indica que los síntomas están producidos principalmente por una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Además, los ensayos son útiles para determinar si una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón mejora en un paciente. En otras palabras, los métodos descritos en este documento pueden utilizarse para evaluar el efecto terapéutico de un tratamiento para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Además, cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en este documento, un aumento o disminución en el nivel de expresión del gen marcador en un paciente, al cual se le ha diagnosticado que padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, implica que la enfermedad ha progresado más.

La gravedad y/o susceptibilidad de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón también puede determinarse basándose en la diferencia en los niveles de expresión. Por ejemplo, cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en este documento, el grado de aumento en el nivel de expresión del gen marcador se correlaciona con la presencia y/o gravedad de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Además, la propia expresión de un gen marcador puede controlarse introduciendo una mutación (o mutaciones) en la región reguladora transcripcional del gen. Los expertos en la materia conocen dichas sustituciones de aminoácidos. Además, el número de aminoácidos que está mutado no está limitado particularmente, mientras que se conserve la actividad. Normalmente, está entre 50 aminoácidos, en determinadas realizaciones no limitantes, en 30 aminoácidos, en 10 aminoácidos o en 3 aminoácidos. El sitio de mutación puede ser cualquier sitio, siempre que se conserve la actividad.

En otro aspecto adicional, en este documento se desvelan métodos de exploración de compuestos candidatos para agentes terapéuticos para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Uno o más genes marcadores se seleccionan del grupo de genes descritos en este documento. Un agente terapéutico para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón puede obtenerse seleccionando un compuesto capaz de aumentar o disminuir el nivel de expresión de un gen (o genes) marcador.

Debe entenderse que la expresión "un compuesto que aumente el nivel de expresión de un gen" se refiere a un compuesto que promueva una cualquiera de las etapas de la transcripción génica, traducción génica o expresión de una actividad de proteína. Por otro lado, la expresión "un compuesto que disminuye el nivel de expresión de un gen", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto que inhibe una cualquiera de estas etapas.

En aspectos particulares, el método de exploración para un agente terapéutico para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón puede realizarse *in vivo* o *in vitro*. Este método de exploración puede realizarse, por ejemplo, (1) administrando un compuesto candidato a un sujeto animal; (2) midiendo el nivel de expresión de un gen (o genes) marcador en una muestra biológica del sujeto animal; o (3) seleccionando un compuesto que aumente o disminuya el nivel de expresión de un gen (o genes) marcador en comparación con el de un control en el que el compuesto candidato no se ha puesto en contacto.

En otro aspecto adicional, en este documento se desvela un método para evaluar la eficacia de un compuesto candidato para un agente farmacéutico sobre el nivel de expresión de un gen (o genes) marcador poniendo en contacto un sujeto animal con el compuesto candidato y monitorizando el efecto del compuesto sobre el nivel de expresión del gen (o genes) marcador en una muestra biológica derivada del sujeto animal. La variación en el nivel de expresión del gen (o genes) marcador en una muestra biológica derivada del sujeto animal puede monitorizarse utilizando la misma técnica a la utilizada en el método de ensayo descrito anteriormente. Además, basándose en la evaluación, por exploración puede seleccionarse un compuesto candidato para un agente farmacéutico.

#### Kits

En otro aspecto, se desvelan diversos kits de diagnóstico y de ensayo. En una realización, un kit es útil para evaluar si un paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. El kit comprende un reactivo para evaluar la expresión de un marcador. En otra realización, un kit es útil para evaluar la idoneidad de un agente químico o biológico para inhibir en un paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Dicho kit comprende un reactivo para evaluar la expresión de un marcador y también puede comprender uno o más de dichos agentes.

En una realización adicional, los kits son útiles para evaluar la presencia de células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón o tratar enfermedades relacionadas con cáncer de pulmón. Dichos kits comprenden un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que se une específicamente con una proteína marcadora o un fragmento de la proteína. Dichos kits también pueden comprender una pluralidad de anticuerpos, derivados de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo en los que la pluralidad de dichos agentes de anticuerpos se une específicamente con una proteína marcadora o con un fragmento de la proteína.

En una realización adicional, los kits son útiles para evaluar la presencia de células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón, donde el kit comprende una sonda de ácido nucleico que se une específicamente con un ácido nucleico marcador o con un fragmento del ácido nucleico. El kit también puede comprender una pluralidad de sondas, en el que cada una de las sondas se une específicamente con un ácido nucleico marcador, o con un fragmento del ácido nucleico.

Las composiciones, kits y métodos descritos en este documento pueden tener los siguientes usos, entre otros: 1) evaluar si un paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón; 2) evaluar la fase de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en un paciente humano; 3) evaluar el grado de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en un paciente; 4) evaluar la naturaleza de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en un paciente; 5) evaluar el potencial para desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en un paciente; 6) evaluar el tipo histológico de células asociadas con una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en un paciente; 7) generar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o derivados de anticuerpo que sean útiles para el tratamiento de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón y/o evaluar si un paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón; 8) evaluar la presencia de células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón; 9) evaluar la eficacia de un o más compuestos de ensayo para inhibir en un paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón; 10) evaluar la eficacia de una terapia para inhibir en un paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón; 11) monitorizar en un paciente la progresión de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón; 12) seleccionar una composición o terapia para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en un paciente; 13) tratar a un paciente que padece una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón; 14) inhibir en un paciente una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón; 15) evaluar el potencial perjudicial de un compuesto de ensayo; y 16) prevenir la aparición de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en un paciente que está en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

Los kits son útiles para evaluar la presencia de células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón (por ejemplo en una muestra tal como una muestra del paciente). El kit comprende una pluralidad de reactivos, pudiendo unirse específicamente cada uno de ellos con un ácido nucleico o proteína marcadora. Como reactivos adecuados para la unión con una proteína marcadora se incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo y similares. Como reactivos adecuados para unirse con un ácido nucleico marcador (por ejemplo, un ADN genómico, un ARNM, un ARNM de corte y empalme, un ADNc o similar) se incluyen ácidos nucleicos complementarios. Por ejemplo, los reactivos para ácidos nucleicos pueden incluir oligonucleótidos (marcados o no marcados) fijados a un sustrato, oligonucleótidos marcados no unidos con un sustrato, pares de cebadores PCR, sondas de baliza molecular y similar.

Los kits pueden comprender opcionalmente componentes adicionales útiles para realizar los métodos descritos en este documento. Como ejemplo, el kit puede comprender líquidos (por ejemplo tampón SSC) adecuados para hibridar ácidos nucleicos complementarios o para unir un anticuerpo con una proteína con la que se une específicamente, uno o más compartimentos para muestras y material con instrucciones que describen la realización del método, una muestra de células pulmonares normales, una muestra de células enfermas relacionadas con cáncer de pulmón y similar.

### **Modelos animales**

En un aspecto general, se desvela un método para producir un modelo animal no humano para evaluar al menos una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. El método incluye exponer al animal a dosis repetidas de al menos un producto químico que se piensa que produce cáncer de pulmón. En determinados aspectos, el método incluye además recoger una o más muestras seleccionadas del animal; y comparar la muestra recogida con uno o más indicios de posible desarrollo o inicio de cáncer de pulmón.

En un aspecto general, se desvela un método para producir el modelo animal que incluye; mantener el animal en un entorno específico sin productos químicos y sensibilizar al animal con al menos un producto químico que se piensa que produce cáncer de pulmón. En determinadas realizaciones, al menos parte del pulmón del animal se sensibiliza por exposiciones secuenciales múltiples. En otro aspecto general, se desvela un método para explorar la eficacia de un agente contra al menos una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. El método incluye generalmente: administrar al menos un agente a un animal de ensayo, determinar si el agente reduce o agrava uno o más síntomas de la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón; correlacionar una reducción en uno o más síntomas con la eficacia del agente contra la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, o correlacionar una ausencia de reducción en uno o más síntomas con la ineficacia del agente. El modelo animal es útil para evaluar una o más rutas metabólicas que contribuyen a al menos uno de inicio, progresión, gravedad, patología, agresividad, grado, actividad, incapacidad, mortalidad, morbilidad, subclasificación de enfermedades u otra características patógena o patológica subyacente de al menos una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. El análisis puede ser mediante uno o más de: agrupamiento jerárquico, construcción de redes de firmas, análisis proteómico de espectroscopia de masas, resonancia de plasmón superficial, modelo estadístico lineal, análisis discriminante con mínimos cuadrados parciales, y análisis de regresión lineal múltiple.

En un aspecto particular, el modelo animal se evalúa para al menos una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, examinando un nivel de expresión de uno o más marcadores, o un equivalente funcional de los mismos.

Los modelos animales creados por los métodos descritos en este documento permitirán la exploración de agentes terapéuticos útiles para el tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Por consiguiente, los métodos son útiles para identificar agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. Los métodos comprenden administrar un agente candidato a un modelo animal constituido por los métodos descritos en este documento, evaluar al menos una respuesta de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en el modelo animal en comparación con un modelo animal control al cual no se ha administrado el agente candidato. Si al menos una respuesta de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón se reduce en cuanto a los síntomas o se retrasa su aparición, el agente candidato es un agente para el tratamiento o prevención de la enfermedad relacionada con cáncer de pulmón.

En otro aspecto, en este documento se desvelan modelos animales para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón en el que el nivel de expresión de uno o más genes marcadores o un gen funcionalmente equivalente con respecto al gen marcador se ha evaluado en el modelo animal. Un "gen funcionalmente equivalente" como se utiliza en este documento generalmente es un gen que codifica una proteína que tiene una actividad similar a una actividad conocida de una proteína codificada por el gen marcador. Un ejemplo representativo de un gen funcionalmente equivalente incluye un homólogo de un gen marcador de un sujeto animal, que es intrínseco para el animal.

El modelo animal para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón es útil para detectar cambios fisiológicos debidos a una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón. En determinadas realizaciones, el modelo animal es útil para revelar funciones adicionales de genes marcadores y para evaluar fármacos cuyas dianas son los genes marcadores.

En una realización, un modelo animal para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón puede crearse controlando el nivel de expresión de un gen homólogo o administrar un gen homólogo. El método puede incluir crear un modelo animal para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón controlando el nivel de expresión de un gen seleccionado del grupo de genes descrito en este documento. En otra realización, el método puede incluir crear un modelo animal para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón administrando la proteína codificada por un gen descrito en este documento, o administrando un anticuerpo contra la proteína. También debe entenderse, que en otras realizaciones determinadas, el marcador puede sobreexpresarse de tal manera que el marcador puede medirse utilizando métodos apropiados.

En otra realización, puede crearse un modelo animal para una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón introduciendo un gen seleccionado de dichos grupos de genes o administrando una proteína codificada por dicho gen.

En otra realización, puede inducirse una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón suprimiendo la expresión de un gen seleccionado de dichos grupos de genes o la actividad de una proteína codificada por dicho gen. Para suprimir la expresión puede utilizarse un ácido nucleico antisentido, una ribozima o un ARNi. La actividad de una proteína puede controlarse eficazmente administrando una sustancia que inhiba la actividad, tal como un anticuerpo.

El modelo animal es útil para aclarar el mecanismo subyacente de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón y también para ensayar la seguridad de los compuestos obtenidos por exploración. Por ejemplo, cuando un modelo animal desarrolla los síntomas de una enfermedad relacionada con cáncer de pulmón, o cuando un valor medido implicado en una determinada enfermedad relacionada con cáncer de pulmón se altera en el animal, puede construirse un sistema de exploración para explorar compuestos que tengan actividad para aliviar la enfermedad.

Como se utiliza en este documento, la expresión "un aumento en el nivel de expresión" se refiere a uno cualquiera de lo siguiente: cuando un gen marcador introducido como un gen extraño se expresa artificialmente; cuando la transcripción de un gen marcador intrínseco al sujeto animal y la traducción del mismo en la proteína están potenciadas; o cuando la hidrólisis de la proteína, que es el producto de traducción, está suprimida. Como se usa en este documento, la expresión "una disminución en el nivel de expresión" se refiere a cualquier estado en el que la transcripción de un gen marcador del sujeto animal y la traducción del mismo en la proteína se inhiben, o el estado en el que la hidrólisis de la proteína, que es el producto de traducción, está potenciado. El nivel de expresión de un gen puede determinarse, por ejemplo, por una diferencia en la intensidad de señal de una microplaca de ADN. Además, la actividad del producto de traducción--la proteína--puede determinarse comparándola con la del estado normal.

También se encuentra dentro del ámbito en cuestión que el modelo animal pueda incluir animales transgénicos, incluyendo, por ejemplo, animales en los que un gen marcador se ha introducido y expresado artificialmente, animales con genes marcadores desactivados (*knock-out*) y animales con genosustituciones (*knock-in*) en los que otro gen se ha sustituido por un gen marcador. Como animal transgénico puede utilizarse un animal transgénico en el que se ha introducido un ácido nucleico antisentido de un gen marcador, una ribozima, un polinucleótido que tiene un efecto de ARNi, o un ADN que actúa como un ácido nucleico señuelo o similar. Dichos animales transgénicos

también incluyen, por ejemplo, animales en los que la actividad de una proteína marcadora se ha potenciado o suprimido introduciendo una mutación (o mutaciones) en la región codificante del gen, o la secuencia de aminoácidos se ha modificado para volverse resistente o susceptible a hidrólisis. Las mutaciones en una secuencia de aminoácidos incluyen sustituciones, deleciones, inserciones y adiciones.

5 Los métodos y reactivos descritos en este documento son representativos de realizaciones preferidas, son ejemplares, y no pretenden limitar el alcance de la invención. Los expertos en la materia realizarán modificaciones en la misma y otros usos.

10 Debe entenderse que, aunque la presente invención se ha descrito específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden realizar modificaciones y variaciones de los conceptos descritos en este documento, y que dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la presente invención como definen las reivindicaciones adjuntas.

15 Por lo tanto, se pretende que la invención no esté limitada a la realización particular descrita en el presente documento contemplada para llevar a cabo la presente invención, no obstante, la invención incluirá todas las realizaciones que están dentro del alcance de las reivindicaciones.

20 La referencia de cualquiera de los documentos citados en el presente documento no pretende ser una admisión de que cualquiera de lo anterior es una técnica anterior pertinente. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o representación en cuanto al contenido de estos documentos se basa en la información disponible para el solicitante y no constituye admisión alguna en cuanto a la corrección de las fechas o el contenido de estos documentos.

## Referencias

- 25
1. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297 (2004).
  2. Pasquinelli, A. E., Hunter, S., Bracht, J. MicroRNAs: a developing story. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 200-205 (2005).
  3. Calin, G. A. & Croce, C.M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 6, 857-866 (2006)
  - 30 4. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs-mi-croRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 259-269 (2006).
  5. Garzon, R., Fabbri, M. *et al.* MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol. Med.* 12, 580-587 (2006).
  6. Volinia, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2257-2261 (2006).
  - 35 7. Yanaihara, N. *et al.* Unique MicroRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9, 189-198 (2006).
  8. Lall, S. *et al.* A Genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. Elegans*. *Curr. Biol.* 16, 460-471 (2006).
  - 40 9. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798 (2003).
  10. John, B. *et al.* Human microRNA targets. *PLoS Biol.* 2, e363 (2004).
  11. Megraw, M., Sethupathy, P., Corda, B., Hatzigeorgiou, A. G. miRGen: A database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res.* 35,D149-D155 (2006).
  - 45 12. Lin, R-K. *et al.* Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer* 55, 205-213 (2007).
  13. Kim, H. *et al.* Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 107, 1042-1049 (2006).
  14. Iliopoulos, D. *et al.* Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer. *Oncogene* 24, 1625-1633 (2005).
  - 50 15. Jemal, A. *et al.* Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 57, 43-66 (2007).
  16. Yoo, C. B., and Jones, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 37-50 (2006).
  17. Schrupp, D. S. & Nguyen, D. M. Targeting the epigenome for the treatment and prevention of lung cancer. *Semin. Oncol.* 32, 488-502 (2005).
  - 55 18. Ulivi, P. *et al.* P16(INK4A) and CDH13 hyper-methylation in tumor and serum of non-small cell lung cancer patients. *J. Cell Physiol.* 206, 611-615 (2006).
  19. Fabbri, M. *et al.* WWOX gene restoration prevents lung cancer growth in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15611-15616 (2005).
  - 60 20. Suzuki, M. *et al.* RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res.* 64, 3137-3143 (2004).
  21. Shen, H. *et al.* A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res.* 62, 4992-4995 (2002).
  - 65 22. Belinsky, S. A. *et al.* Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res.* 63, 7089-7093 (2003).

23. Krek, A. *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495-500 (2005).
24. Vatolin, S., Navaratne, K., Weil, R. J. A novel method to detect functional microRNA targets. *J. Mol. Biol.* 358,983-996 (2006).
- 5 25. Chen, C. *et al.* Real-time quantification of micro-RNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33,e179 (2005).
26. Liu, Z. *et al.* Characterization of in vitro and in vivo hypomethylating effects of decitabine in acute myeloid leukemia by a rapid, specific and sensitive LC-MS/MS method. *Nucleic Acids Res.* 35, e31 (2007).
27. Ehrich, M. *et al.* Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-spe-cific cleavage and mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15785-15790 (2005).

10 **Referencias adicionales (indicadas en la Sección de Métodos)**

1. Chen, C. *et al.* Real-time quantification of micro-RNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33,e179 (2005).
- 15 2. Fabbri, M. *et al.* WWOX gene restoration prevents lung cancer growth in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15611-15616 (2005).
3. Vatolin, S., Navaratne, K., Weil, R. J. A novel method to detect functional microRNA targets. *J. Mol. Biol.* 358, 983-996 (2006).
- 20 4. Liu, Z. *et al.* Characterization of in vitro and in vivo hypomethylating effects of decitabine in acute myeloid leukemia by a rapid, specific and sensitive LC-MS/MS method. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkl1156 (2007).
5. Ehrich, M. *et al.* Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15785-15790(2005).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uno o más miR-29 para su uso en la restauración de un patrón de metilación de ADN deseado en cáncer de pulmón, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más miR-29 suficiente para dirigirse a una o más de DNMT3A y DNMT3B, en donde el uno o más miR-29 se seleccionan del grupo que consiste en miR-29a y miR-29c y el cáncer de pulmón es un carcinoma pulmonar no microcítico.
- 10 2. Uno o más miR-29 para su uso en la inducción de la reexpresión de genes supresores de tumores (GST) silenciados por metilación en cáncer de pulmón, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más de miR-29 suficiente para dirigirse a una o más de DNMT3A y DNMT3B, en donde el uno o más miR-29 se seleccionan del grupo que consiste en miR-29a y miR-29c y el cáncer de pulmón es un carcinoma pulmonar no microcítico.
- 15 3. El uno o más miR-29 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el GST comprende uno o más de FHIT y WWOX.
- 20 4. Uno o más miR-29 para su uso en la inhibición de tumorigenicidad en cáncer de pulmón, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más miR-29 suficiente para dirigirse a una o más de DNMT3A y DNMT3B, en donde el uno o más miR-29 se seleccionan del grupo que consiste en miR-29a y miR-29c y el cáncer de pulmón es carcinoma pulmonar no microcítico.
- 25 5. Uno o más miR-29 para su uso en la reducción de la metilación del ADN global en cáncer de pulmón, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más miR-29 que se dirigen a DNMT3A y DNMT3B, en donde la expresión del miR-29 contribuye a modificaciones epigenéticas del ADN en una célula cancerosa, en donde el uno o más miR-29 se seleccionan del grupo que consiste en miR-29a y miR-29c y el cáncer de pulmón es carcinoma pulmonar no microcítico.
- 30 6. Una combinación de uno o más miR-29 y de al menos un análogo nucleosídico, para su uso en conseguir la hipometilación del ADN en cáncer de pulmón, siendo dicho uno o más miR-29 suficientes para bloquear las rutas de DNMT *de novo* y de mantenimiento, en donde el uno o más miR-29 se seleccionan del grupo que consiste en miR-29a y miR-29c y el cáncer de pulmón es carcinoma pulmonar no microcítico.
- 35 7. La combinación de uno o más miR y de al menos un análogo nucleosídico para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el análogo nucleosídico comprende decitabina.
- 40 8. Uno o más miR-29 para su uso en el aumento de la expresión de un gen supresor de tumor (GST) en cáncer de pulmón, que comprende transfectar una célula de carcinoma pulmonar no microcítico con uno o más miR-29, en donde el uno o más miR-29 se seleccionan del grupo que consiste en miR-29a y miR-29c.
- 45 9. El uno o más miR-29 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el GST comprende una o más de las proteínas FHIT y WWOX.
- 50 10. miR-29 sintéticos para su uso en la reactivación de supresores tumorales y en la normalización de patrones de metilación aberrantes en una célula de carcinoma de pulmón no microcítico en el desarrollo de una terapia epigenética, siendo dicho uso en solitario o en combinación con otros tratamientos, en donde uno o más miR-29 se selecciona del grupo que consiste en miR-29a y miR-29c.
11. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un carcinoma pulmonar no microcítico, que comprende:
  - al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR-29a, miR-29c y una combinación de los mismos; y
  - un vehículo farmacéuticamente aceptable.



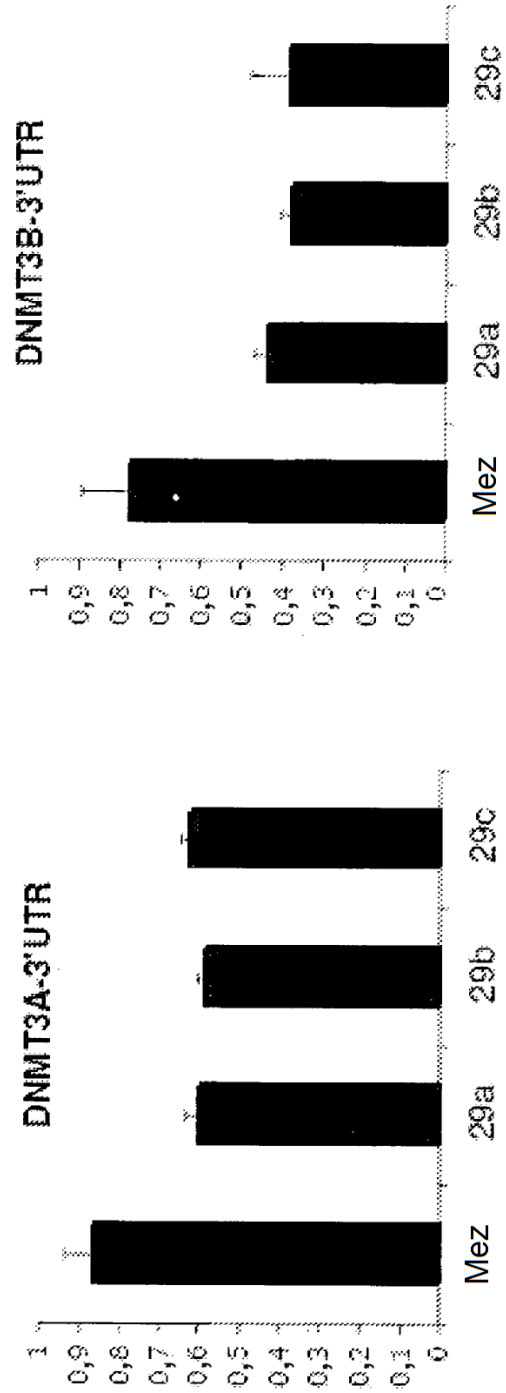


Figura 2a

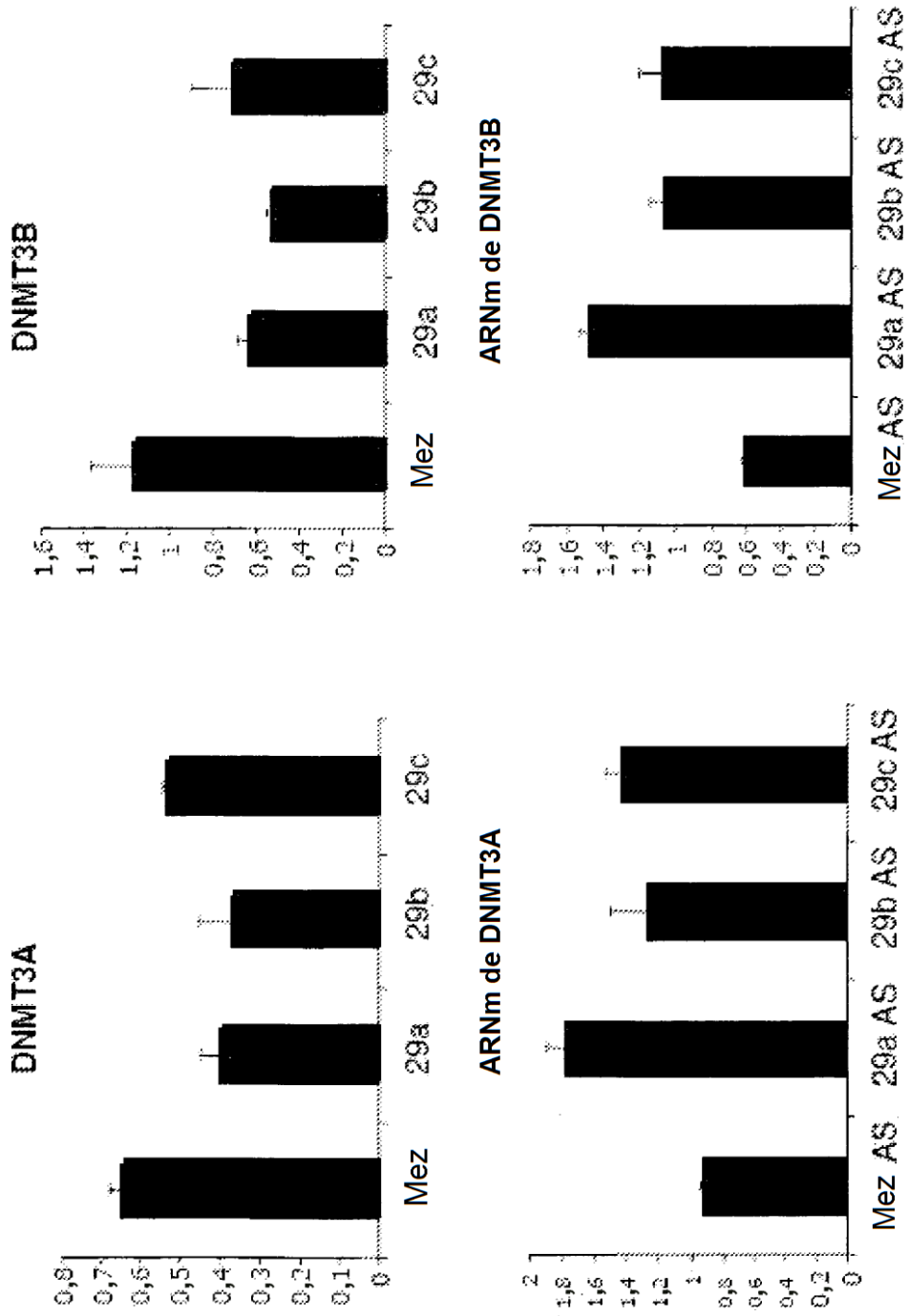
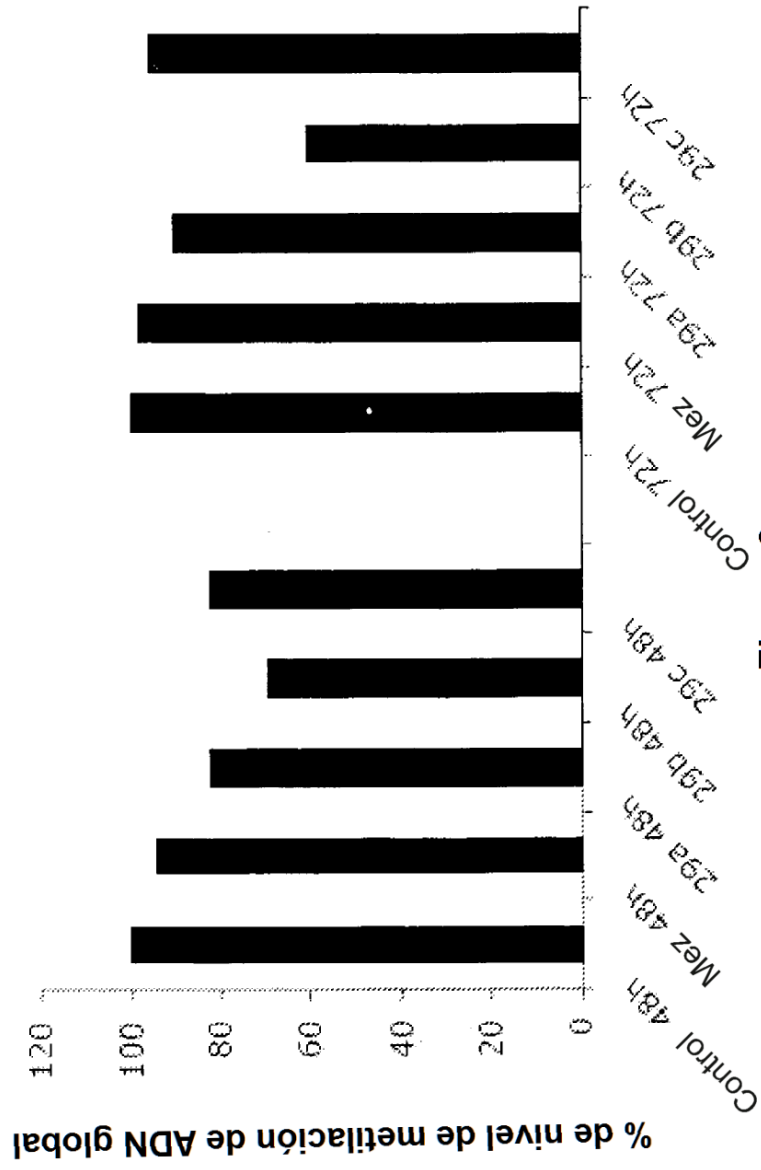


Figura 2b



**Cambios de metilación de ADN global en A549**



**Figura 3a**

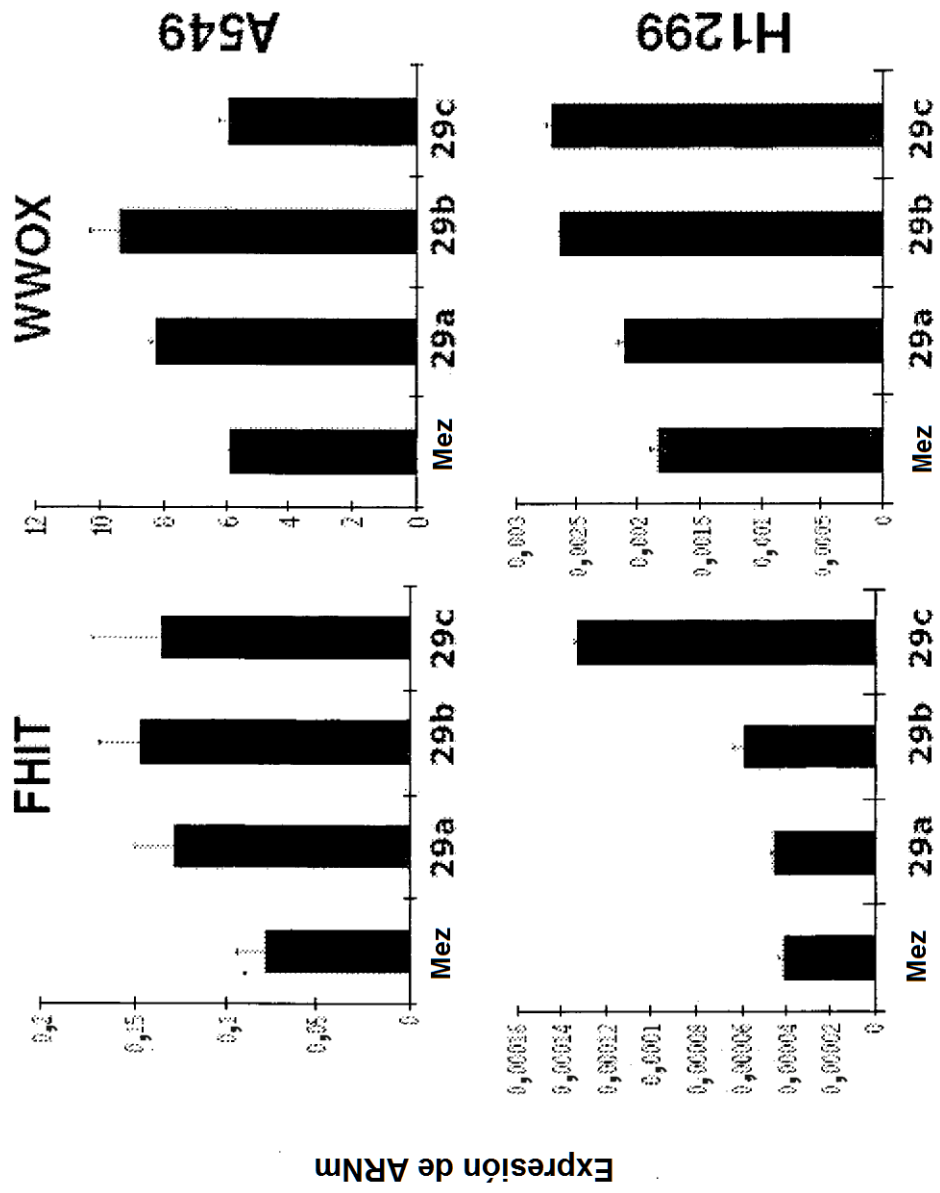


Figura 3b



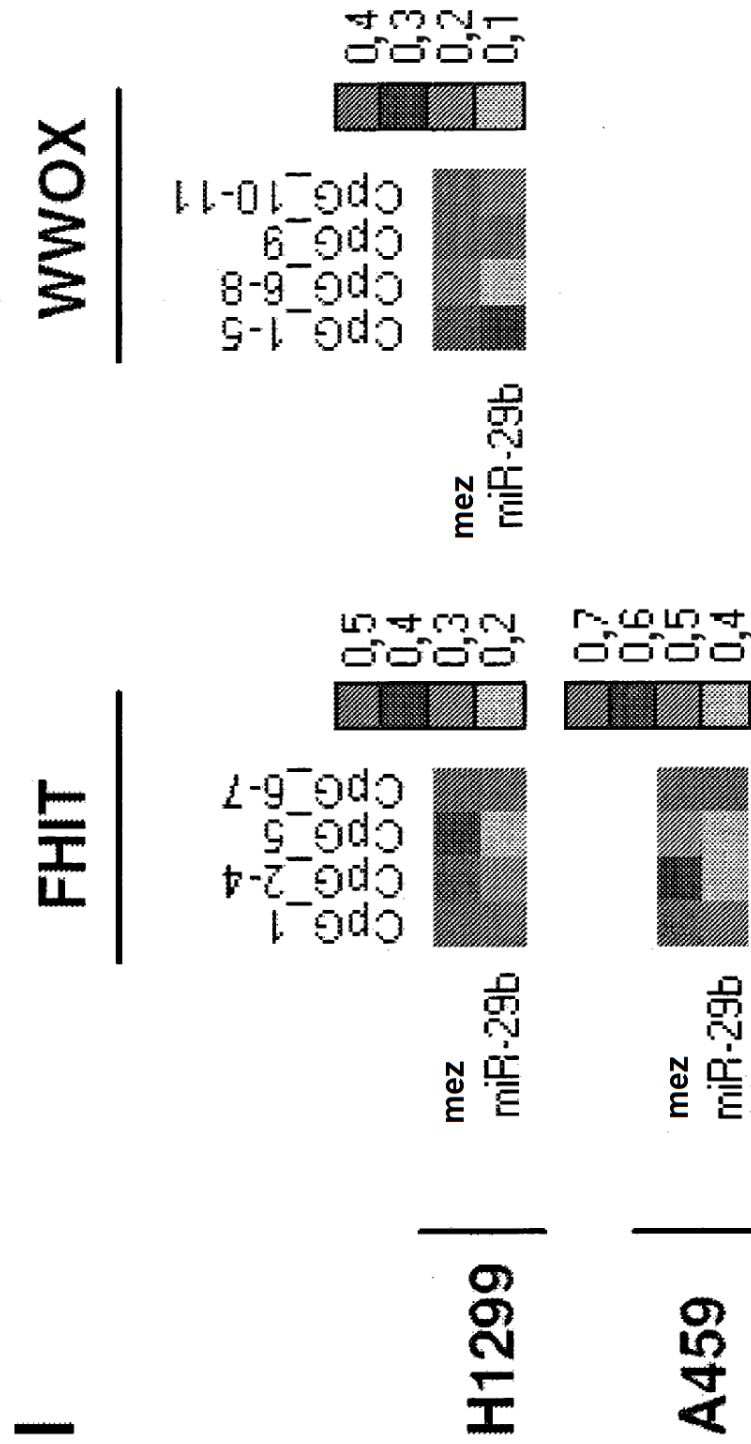


Figura 3d

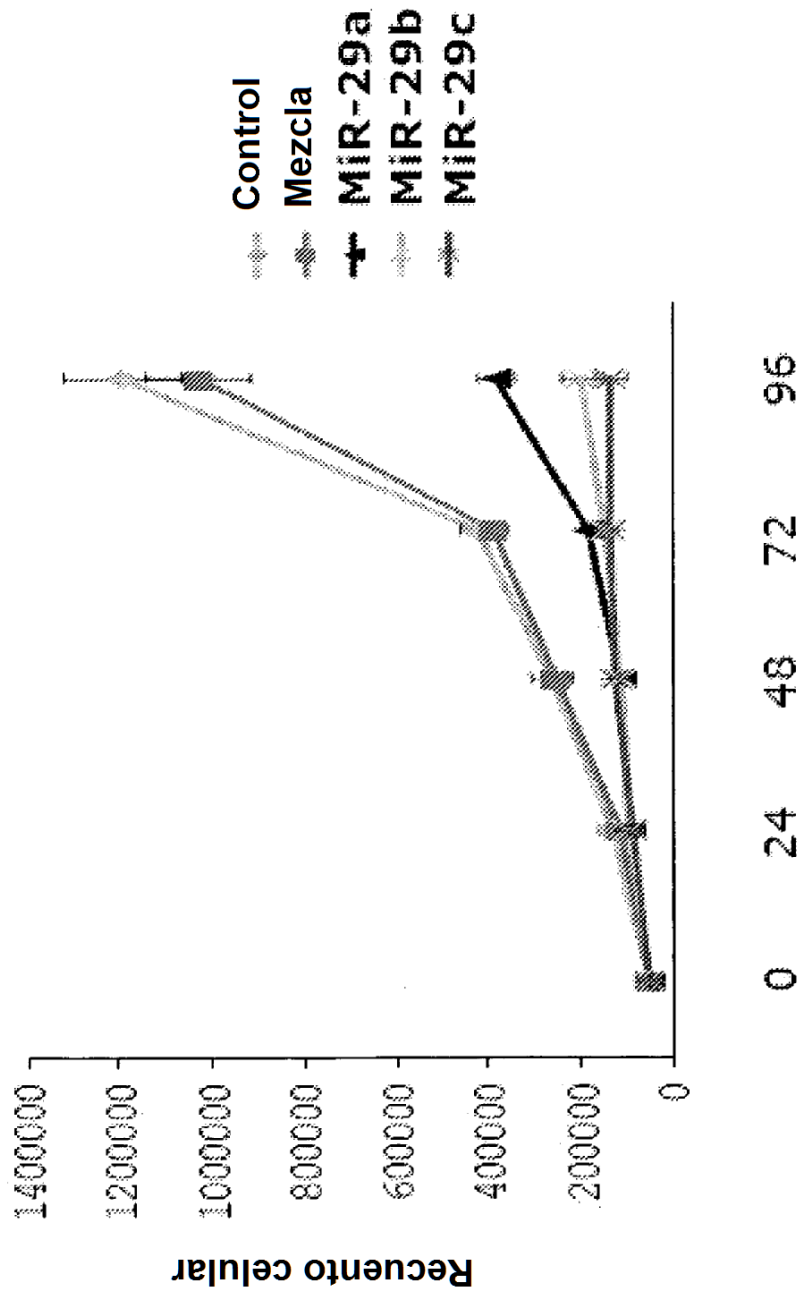


Figura 4a

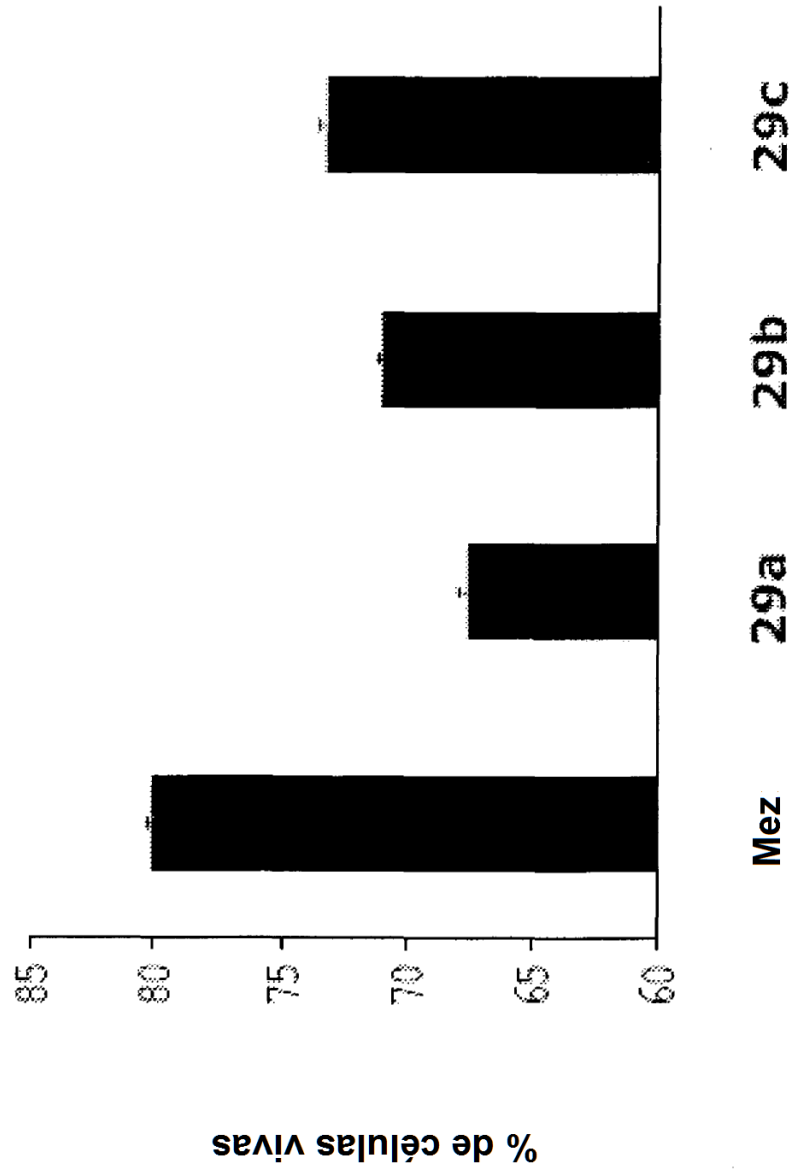


Figura 4b

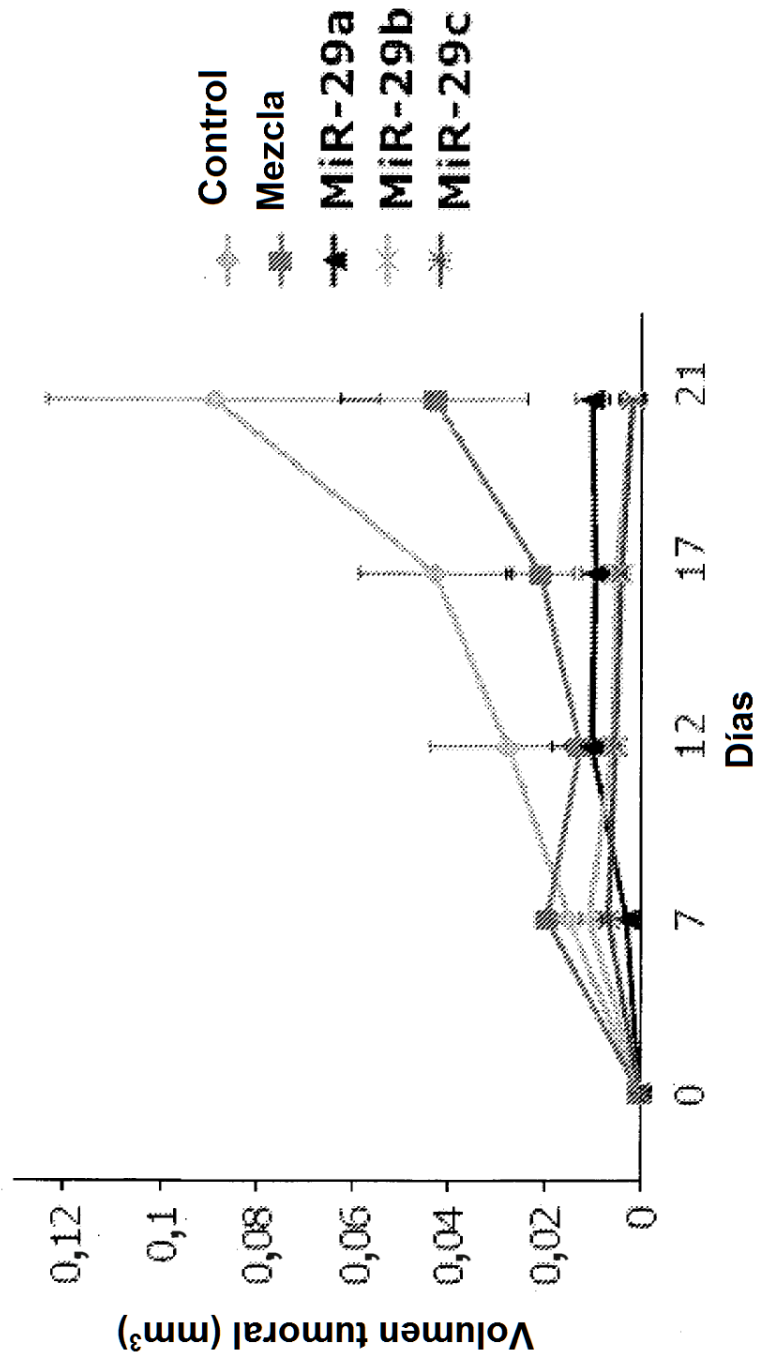


Figura 4c

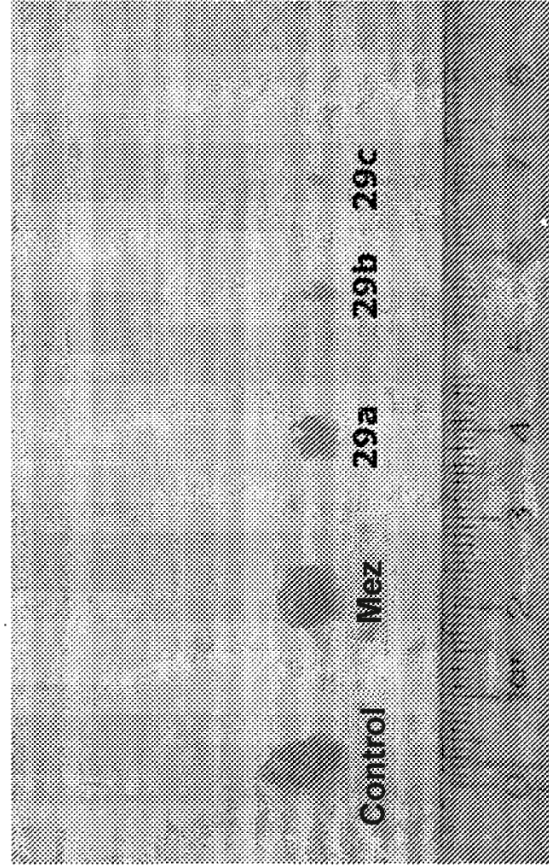
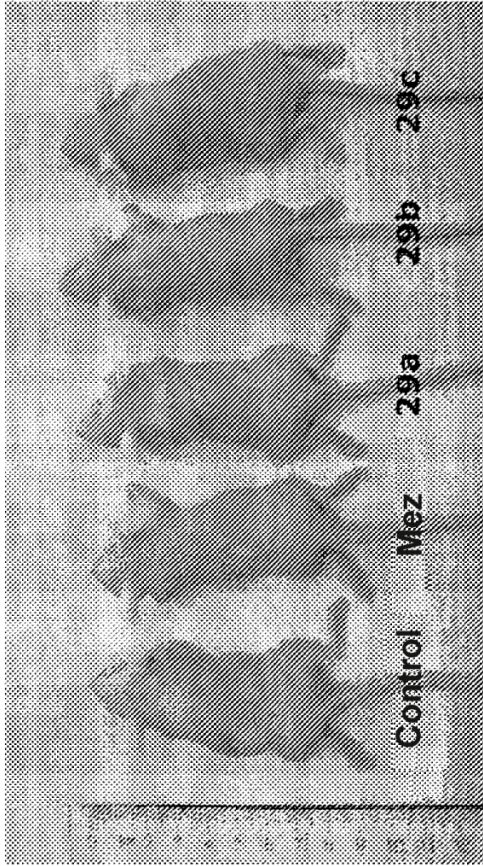


Figura 4d

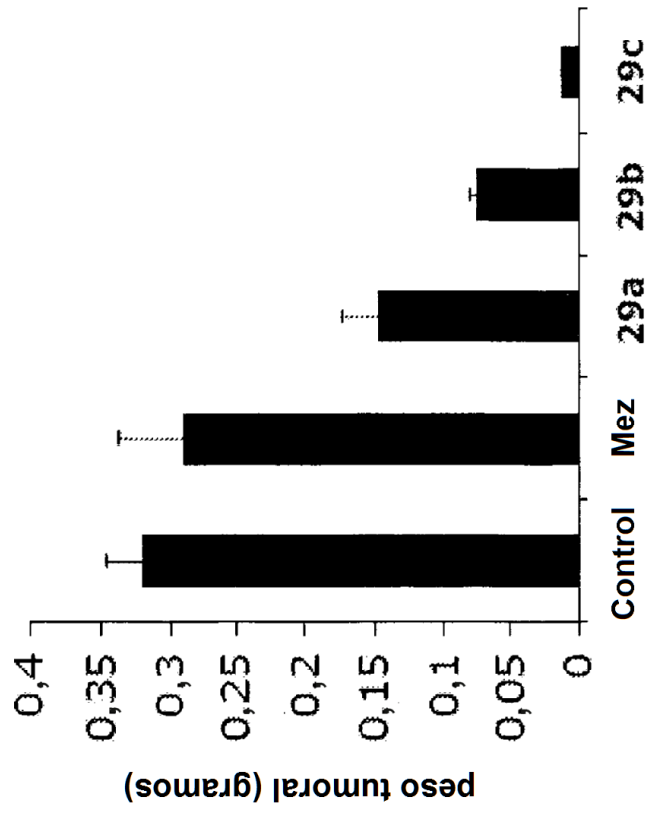


Figura 4e

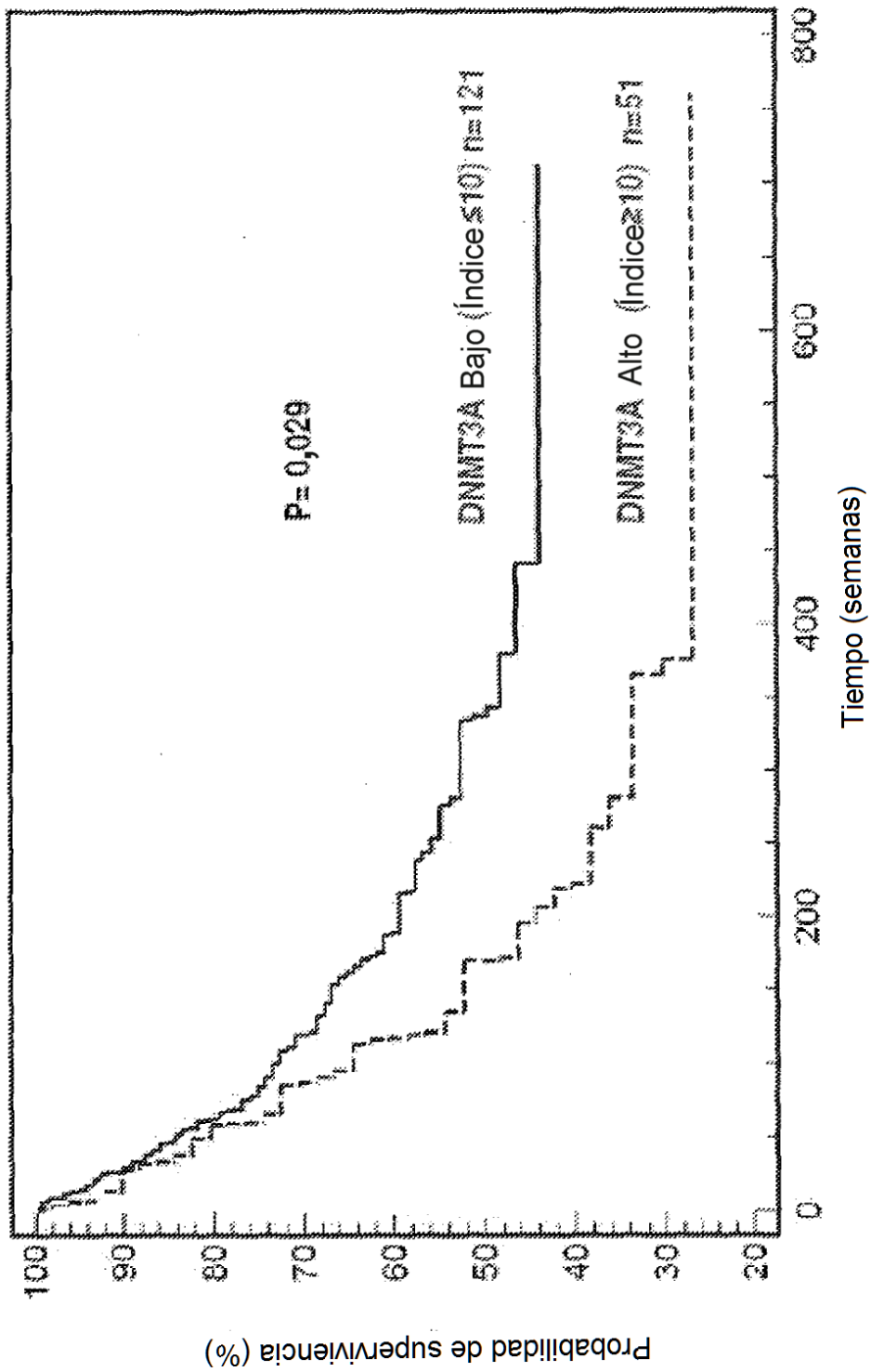
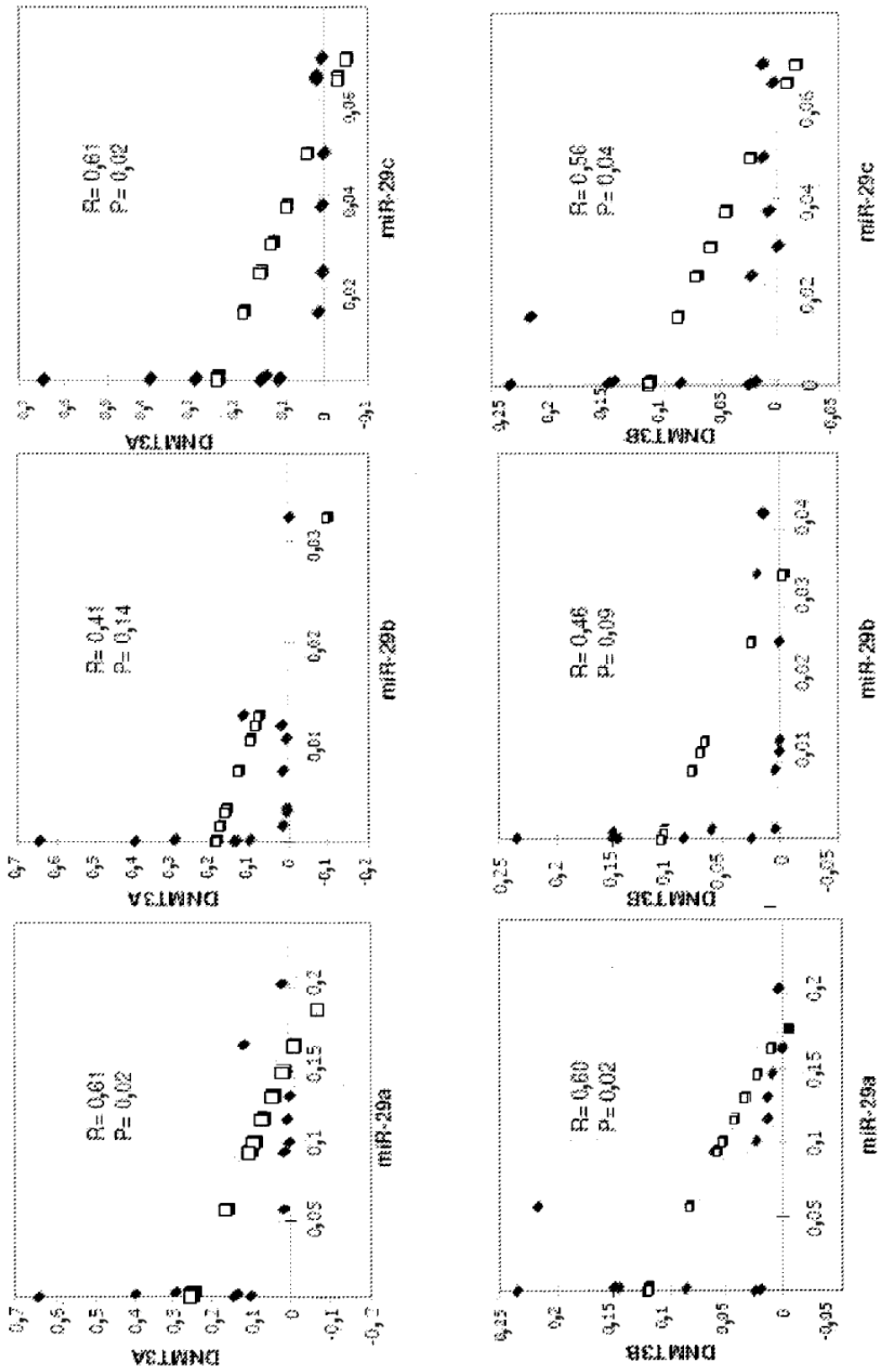


Figura 5



miR-29a  
miR-29b  
miR-29c  
**Figura 6**