(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
18 de febrero de 2021 (18.02.2021)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2021/028610 A2

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12N 15/113 (2010.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2020/070512

(22) Fecha de presentación internacional:
12 de agosto de 2020 (12.08.2020)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201930743 13 de agosto de 2019 (13.08.2019) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela, A Coruña (ES). **SERVIZO GALEGO DE SAÚDE** [ES/ES]; Edificio Administrativo de San Lázaro, San Lázaro s/n, E-15703 Santiago de Compostela, A Coruña (ES).

(72) Inventores: **ÁLVAREZ VILLAMARÍN, Clara**; UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela, A Coruña (ES). **SOUSA RODRIGUES, Joana**; UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela, A Coruña (ES). **CAMESELLE TEIJEIRO, José Manuel**; Choupana, s/n, E-15707 Santiago de Compostela, A Coruña (ES).

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Intellectual Property Law, S.L., Avda. de Burgos, 16D , Edificio EUROMOR, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*

— *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

WO 2021/028610 A2

(54) **Title:** COMPOUNDS AND METHODS FOR TREATING CANCER

(54) **Título:** COMPUESTOS Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER

(57) **Abstract:** The invention relates to compounds and compositions capable of specifically silencing mRNA expression of isoform PIAS2-beta, in addition to using them for treating cancer and, in particular, anaplastic thyroid carcinoma.

(57) **Resumen:** La invención se refiere a compuestos y composiciones capaces de silenciar de forma específica el ARNm de la isoforma beta de la proteína PIAS2 así como al uso de los mismos para el tratamiento del cáncer y, en particular, del carcinoma anaplásico de tiroides.

COMPUESTOS Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a nuevos agentes farmacológicos en terapias avanzadas contra el cáncer. Más concretamente, la invención se refiere a la inhibición de la expresión de un marcador para inducir la muerte e inhibir la proliferación de células tumorales de carcinomas indiferenciados o pobremente diferenciados de la glándula tiroides.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los tumores tiroideos son los tumores malignos más comunes de los órganos endocrinos y su incidencia se ha incrementado en los últimos años. La mayoría de los tumores tiroideos malignos derivan de células foliculares, se denominan carcinomas y de acuerdo con sus características histológicas y clínicas se dividen en tres grandes grupos: a) carcinoma diferenciado, b) carcinoma pobremente diferenciado, y c) carcinoma indiferenciado.

Los carcinomas diferenciados del epitelio folicular de la glándula tiroides se han convertido en uno de los cánceres más frecuentes en mujeres. La terapia es efectiva, aunque ningún paciente puede darse por curado debido a la posibilidad de recurrencia, bien como persistencia bien como recrecimiento, hasta muchos años después.

En cuanto a los carcinomas indiferenciados/anaplásicos, los carcinomas pobremente diferenciados y lo carcinomas diferenciados que recurren forman parte del grupo de carcinomas avanzados. Los carcinomas indiferenciados/anaplásicos son considerados una enfermedad huérfana ya que suponen un número muy pequeño de casos, con un pronóstico letal en pocos meses. Los nuevos tratamientos vienen del uso compasivo individual de tratamientos descubiertos para otros cánceres en pacientes que han recibido varias modalidades terapéuticas muy agresivas en poco tiempo, sin que pueda haber un ensayo clínico controlado ante la escasez de pacientes vivos.

Por tanto, hay una necesidad en el campo de proporcionar nuevos tratamientos más eficaces para tratar los carcinomas del epitelio folicular de la glándula tiroides, en particular los carcinomas indiferenciados/anaplásicos.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en hallazgo de que la inhibición de la expresión de la proteína PIAS2β resulta en la inhibición específica de la proliferación e inducción de muerte de células de carcinoma indiferenciado o pobremente diferenciado de la glándula tiroides. Por tanto, la inhibición de PIAS2β da lugar a una reducción del crecimiento de este tipo de carcinomas. Además, de manera sorprendente, los inventores han observado que la proteína PIAS2β está menos expresada en células de carcinoma indiferenciado o pobremente diferenciado de la glándula tiroides que en células de tejido normal o que en células de carcinoma diferenciado papilar de tiroides.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos antisentido complementaria a una región diana del ARNm PIAS2β, en el que la unión del ácido nucleico a su secuencia diana produce la inhibición de la expresión del ARNm PIAS2β.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia antisentido del ácido nucleico del primer aspecto la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una célula huésped que comprende el ácido nucleico del primer aspecto de la invención, o el vector del segundo aspecto de la invención.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico del primer aspecto de la invención, o el vector del segundo aspecto de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable del cuarto aspecto de la invención.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un inhibidor de la proteína PIAS2β, para su uso en el tratamiento del cáncer de un paciente.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a un método de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar de forma diferencial la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β o de la isoforma α del gen PIAS2 en una muestra, dicho proceso comprende:

(a) proporcionar al ensayo de PCR que contiene dicha muestra un oligonucleótido marcado que contenga una secuencia complementaria a una región del ácido

nucleico diana, en donde dicho oligonucleótido marcado se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana uniéndose por los cebadores del paso (b) y en donde dicho oligonucleótido marcado tiene la secuencia SEQ ID NO:87 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o SEQ ID NO:88 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2;

(b) proporcionar una pareja de cebadores, en donde el primer cebador contenga una secuencia complementaria a una región de una cadena de la secuencia de ácido nucleico diana e inicie la síntesis de un producto de extensión y un segundo cebador que contenga una secuencia complementaria a la otra cadena de la secuencia de ácido nucleico diana o complementaria a una región en el producto de extensión del primer cebador e inicie la síntesis de una cadena complementaría de DNA; y en donde cada cebador se selecciona para que se hibride con su molde complementario corriente arriba de cualquier oligonucleótido marcado hibridado con la misma cadena de ácido nucleico en donde la pareja de cebadores está formada por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:90 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:91 y SEQ ID NO:92 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2,

(c) amplificar la secuencia de ácido nucleico diana empleando una polimerasa de ácido nucleico con actividad nucleasa 5' a 3' como agente polimerizante dependiente de molde bajo condiciones permisivas para los pasos de ciclación de la PCR de (i) hibridación de los cebadores y el oligonucleótido marcado con una secuencia de ácido nucleico molde contenida dentro de la secuencia diana, y (ii) extensión del cebador en donde dicha polimerasa de ácido nucleico sintetiza un producto de extensión de cebador mientras la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa de ácido nucleico libera simultáneamente fragmentos marcados de las dobles cadenas hibridadas que comprenden oligonucleótidos marcados y sus complementarias secuencias molde de ácido nucleico, creando de este modo fragmentos marcados detectables y

(d) detectar y/o medir la señal generada por la hidrólisis del oligonucleótido marcado para determinar la presencia o ausencia de la secuencia diana en la muestra.

En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un kit para la detección diferencial de la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β o de la isoforma α del gen PIAS2 en una muestra que comprende:

(a) al menos un oligonucleótido marcado que contiene una secuencia complementaria a una región del ácido nucleico diana en donde dicho oligonucleótido marcado tiene la secuencia SEQ ID NO:87 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o SEQ ID NO:88 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2 y en donde el extremo 3' del oligonucleótido marcado esté bloqueado para prevenir la extensión por una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad 5' a 3 y el oligonucleótido marcado contiene marcadores primeros y segundos estando el primer marcador separado del segundo por un sitio susceptible de escisión por una nucleasa y en el que los marcadores del oligonucleótido marcado constituyen un par de marcadores generadores de señales interactivas situados sobre el oligonucleótido para apantallar la generación de señal detectable y

(b) al menos una pareja de cebadores, formada por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:90 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:91 y SEQ ID NO:92 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Estudio de expresión diferencial mediante 2D-proteómica entre cultivos de tejido normal/benigno y carcinoma papilar de tiroides. **A)** Se muestran dos geles de los cultivos "benignos" y dos geles de "carcinoma papilar" tras la segunda dimensión y la tinción de plata. **B)** Spots más diferentes tras el análisis con PDQuest. **C)** Se muestra la repetición del análisis con el programa SameSpots para el spot 8002. **D)** Identificación de tres de los spots significativamente incrementados y de dos de los significativamente reducidos en carcinomas papilares. (Mann-Whitney; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$).

Figura 2. El gen de PIAS2 humano: sus isoformas de mRNA y proteína con la equivalencia entre los códigos de los dos consorcios internacionales, Ensembl y NCBI.

Figura 3. Expresión de PIAS2b y PIAS2a en tejidos de tiroides humano normal, de proliferación benigna y cáncer. **A)** Expresión de mRNA de PIAS2b y PIAS2a medida por PCR cuantitativa qRT-PCR TaqMan. **B)** Comparación de los niveles detectados por parejas de tejidos que proceden del mismo paciente, cáncer PTC frente a su tejido normal correspondiente. (NT, tiroides normal; MNG, bocio multinodular; PTC, carcinoma papilar; PDTC, carcinoma pobremente diferenciado; ATC, carcinoma anaplásico). (Kruskal-Wallis; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ****, $p<0.000$).

Figura 4. PIAS2b dsRNAi inhibe la proliferación de líneas de carcinoma anaplásico de tiroides. A) Expresión del mRNA de PIAS2 global y de cada una de las isoformas de la proteína en las líneas de cáncer comparadas con un cultivo de células normales que crece indefinidamente (T-NT2). BCPAP y FTC-238 proceden de carcinomas pobremente diferenciados (PDTC) papilar o folicular respectivamente; 8305C, CAL-62, BHT-101, MB-1 proceden de carcinomas anaplásicos de distintos continentes y background genético. **B)** Secuencia de los exones 12, 13 y 14 del gen de PIAS2 señalando las diferencias entre las dos isoformas PIAS2a y PIAS2b. En línea discontinua se engloban las secuencias diana de dsRNAi 1 y de dsRNAi2 de 5' a 3'. Subrayado se muestran las bases correspondientes a los aminoácidos del epitopo del anticuerpo mPIAS2 (color oscuro en el Exón 12) y del anticuerpo rPIAS2 (color claro en el Exón 14). **C-D)** PIAS2 dsRNAi 1 reprime la expresión de mRNA medido por qRT-PCR **(C)** y de la proteína **(D)**, específicamente de la isoforma beta, en todas las líneas celulares. Se obtuvo el mismo resultado con dos anticuerpos distintos: mPIAS2, ratón anti-PIAS2 humano, y rPIAS2, conejo anti-PIAS2b humano. Abajo: cuantificación de la proteína PIAS2 de p75 kDa con respecto al control de carga GAPDH en los westerns. **E-G)** Efecto de PIAS2b dsRNAi 1, PIAS2b dsRNAi 2 o la suma de ambos en FTC-238 **(E)**, BCPAP **(F)** o las cuatro líneas de carcinoma anaplásico **(G)**. La eficiencia de transfección fue superior al 50% en todas las líneas. (A: Kruskal-Wallis; C: Mann-Whitney; D: ANOVA; E-G: Two-way ANOVA with repeated measurements. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.000$).

Figura 5. PIAS2b dsRNAi: isoformas de PIAS2 reconocidas. Tanto la secuencia 1 como la 2 reconocen una única isoforma de proteína PIAS2-204 (PIAS2b) y una isoforma no codificante PIAS2-202 basándonos en códigos Ensembl. Se muestra la equivalencia con los códigos NCBI.

Figura 6. Cultivos primarios de tejido benigno (T-MNG) y de carcinoma anaplásico (T-UC) establecidos a partir de fragmentos independientes de sobrantes quirúrgicos de dos pacientes operados por esta enfermedad. **A)** De esta paciente se establecieron dos cultivos anaplásicos T-UC1 y T-UC2 y un cultivo de tejido benigno T-MNG94. **B)** De esta paciente se establecieron dos cultivos benignos (T-MNG178 y T-MNG179) y un cultivo anaplásico (T-UC3).

Figura 7. PIAS2b dsRNAi 1 inhibe el crecimiento de cultivos primarios anaplásicos de pacientes, pero no de sus cultivos normales, de bocio o de carcinoma diferenciado. **A)** Expresión de mRNA de PIAS2 total, y sus isoformas en cultivos individuales de distinto origen patológico. Se indica el pase de cultivo (división de las células obtenidas a dos nuevos platos vacíos) a partir del pase 1 (p1) en el que se establece el cultivo. T-NT, cultivo de tiroides normal; T-MNG, cultivo de bocio multinodular; T-PC, cultivo de carcinoma papilar, T-UC, cultivo de carcinoma anaplásico. **B)** Cuantificación de la expresión del mRNA de PIAS2 por grupos de cultivos del mismo origen patológico. Se muestran los tres ensayos: global PIAS2, que mide todas las isoformas codificantes; PIAS2b, que mide la isoforma codificante PIAS-204 (PIAS2b) y PIAS2a, que mide la isoforma codificante PIAS-201 (PIAS2a). Se observa que los cultivos anaplásicos (T-UC) expresan significativamente poco PIAS2, mientras que los cultivos de carcinoma papilar (T-PC) expresan más PIAS2 tal como lo hacen sus tejidos de origen como se demostró en el dibujo 3. Se observa especialmente marcado este resultado al medir la isoforma PIAS2b. **C-F)** PIAS2b dsRNAi 1 reprime la expresión de la proteína PIAS2b en cultivos derivados de T-NT (**C**), T-MNG (**D**), carcinoma diferenciado papilar T-PC (**E**), y T-UC (**F**). **G)** PIAS2b dsRNAi 1 reprime específicamente la expresión del mRNA de PIAS2b, pero no de PIAS2a en T-NT y T-UC. **H)** Efecto de PIAS2b dsRNAi 1 frente al control ns-dsRNAi en la proliferación de cultivos de distinto origen patológico, medida seis días después de transfectado. **I-J)** Efecto de PIAS2b dsRNAi 1 en la proliferación a lo largo del tiempo de cultivos de distinto origen. **I)** Cultivo de tiroides

normal T-NT, y T-MNG94. **J)** Cultivos T-UC1 y T-UC2, y en T-UC3 (T-MNG94 procede del mismo paciente que T-UC1 y T-UC2)
(A-B: Kruskal-Wallis; F-G-H-I: Mann-Whitney; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.000$)

Figura 8. PIAS2b dsRNAi tiene un efecto antitumoral citotóxico que provoca catástrofe mitótica en cultivos y líneas celulares anaplásicas y de pobremente diferenciado. Las células fueron registradas en el tiempo por video-microscopía durante tres días tras el tratamiento con PIAS2b dsRNAi (barras negras) o ns-dsRNAi (barras blancas). T-UC1, T-UC2, 8305-C y CAL-62 se trataron con PIAS2b dsRNAi 1; BCPAP se trató con PIAS2b dsRNAi 2. **A-E Parte superior)** Cuantificación del número de células que lograban terminar una mitosis (Mitotic Completion), de las células que quedan paradas en la mitosis (Mitotic Arrest), y de las células que se mueren durante el proceso de mitosis (Cell death at Mitosis o Catástrofe Mitótica). **A-E Parte inferior)** Clasificación de la fase de la mitosis en el que las células tratadas con PIAS2b dsRNAi entran en catástrofe mitótica.

Figura 9. La expresión de shRNA contra PIAS2 (que reprime ambas isoformas) en células CAL-62 reduce la proliferación impidiendo la división celular, pero el efecto es moderado y poco duradero en el tiempo. **A)** Poblaciones infectadas con lentivirus y seleccionadas por su intensidad en fluorescencia RFP, expresando la secuencia control T-Scr-shRNA y dos poblaciones expresando la secuencia T-PIAS2-shRNA, y con intensidad creciente para RFP en el sorter: T-PIAS2$_{HI}$_sh y T-PIAS2$_{SU}$_sh. Las células fueron tratadas con vehículo y dos concentraciones de Doxiciclina (Doxy) que inducen el shRNA. **B)** RT-PCR de la expresión de las dos isoformas de PIAS2 codificantes de proteína PIAS2b y PIAS2a en ausencia o presencia de 2 microg/ml de Doxiciclina en la población control T-Scr_sh y la población T-PIAS2$_{HI}$_sh. **C)** Western blot para p75 PIAS2b con los dos anticuerpos mPIAS2 y rPIAS2, en presencia o ausencia de Doxiciclina. **D)** Experimento tiempo-respuesta a 7 y 9 dias.
(A: ANOVA; B: T-test. E: Mann-Whitney. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.000$)

Figura 10. Modelo in vivo de carcinoma anaplásico de tiroides con xenoinjerto derivado de Paciente ortotópico (oPDX). **A)** Células infectadas sin virus y con el virus expresando

mCherry al microscopio óptico de fluorescencia/contraste de fases (aumento de 20x). **B)** Los mismos pocillos fotografiados tras la adición del sustrato luciferina fotografiados directamente en el IVIS, donde se registrarán posteriormente los animales con el xenoinjerto. **C)** Cuantificación de la emisión de luz en luminómetro. **D)** Cinco ratones con oPDX de 2 semanas de evolución, registrados en el IVIS antes (Before) y después (After) de la inyección intraperitoneal de Luciferina, y seguidos a lo largo del tiempo. Se observa la imagen completa (Full image) y la señal específica de luz emitida por el cáncer oPDX en el cuello de los animales (Lux signal substracted).

Figura 11. PIAS2 dsRNAi 1 tiene acción anticancerosa in vivo. **A)** Esquema del experimento con la generación de los ratones oPDX y el tratamiento con PIAS2b dsRNAi 1 (negro) o ns-dsRNAi (gris) una vez /semana durante tres semanas. El seguimiento se realizó con el IVIS una vez/semana. **B)** Curvas de evolución individuales ajustadas al 100% a la semana 5, momento en el que se comenzó el tratamiento. Evaluación final de cada respuesta individual según código RECIST (PD= Progressive disease; SD= Stable Disease; PR= Partial response). En gris, líneas discontinuas finas, animales tratados con ns-dsRNAi 1; en negro, líneas continuas finas animales tratados con PIAS2b dsRNAi 1. El análisis estadístico demostró una diferencia significativa al final del tratamiento. En grueso, línea de ajuste matemático LOWESS para poblaciones de datos que demuestra crecimiento de los cánceres oPDX en los animales tratados con ns-dsRNAi (gris) frente a estabilización o disminución del crecimiento en los tratados con dsRNAi 1 (negra). La curva LOWESS coincide con la evaluación por RECIST. **C)** Muestra de dos ratones tratados con ns-dsRNAi y PIAS2b dsRNAi 1 y la señal de luminiscencia al principio y al final de los tratamientos. **D)** Análisis de intensidad inicial y final que demuestra una diferencia estadísticamente significativa entre los dos tratamientos. **E)** Disección de los carcinomas en el punto final. Se observan diferencias a simple vista. **F)** Los tumores fueron fijados, seccionados y su volumen tridimensional calculado a partir de las secciones. La diferencia de volumen del tejido fijado, calculado a partir de mediciones en las secciones, tiene una $p=0.1$. **G)** Hematoxilina-Eosina de los carcinomas mostrando invasión de la tiroides sana y de estructuras adyacentes como músculo y vasos. Es una imagen semejante a lo que hace este carcinoma en un paciente. **H)** La inmunohistoquímica realizada con las mismas condiciones que para patología humana muestra positividad para citoqueratinas global (A1A3) y para CK8/CK18 como se espera en

un carcinoma anaplásico. El carcinoma es negativo para marcadores de diferenciación de tiroides (Tiroglobulina, TG; NKX2.1, TTF1) pero muy positivo para Ki67, p53 y PAX8. **I)** Contaje sistemático de las células del carcinoma muertas o en transición (puntos y flechas negros) frente a las células totales (puntos grises). La cuantificación mostró diferencias significativas en los carcinomas tratados. (B: Anova de medidas repetidas; D: Mann-Whitney; F-I: T-test. *, $p<0.05$)

Figura 12. PIAS2 dsRNAi 1 inhibe el crecimiento de tres tipos de carcinoma no tiroideo con las mismas características que el carcinoma anaplásico de tiroides. A) Efecto de PIAS2 dsRNAi 1 o su control ns-dsRNAi sobre el crecimiento a lo largo de los días de las células de carcinoma indiferenciado/ anaplásico de páncreas PANC-1. B) Efecto de PIAS2 dsRNAi 1 o su control ns-dsRNAi sobre el crecimiento a lo largo de los días de las células de carcinoma indiferenciado / anaplásico de células gigantes de pulmón COR-L23. Estas células crecen tan rápido que a partir de tres días en el mismo pocillo las controles ya flotan superando la superficie de crecimiento. C) Efecto de PIAS2 dsRNAi 1 o su control ns-dsRNAi sobre el crecimiento a lo largo de los días de las células de carcinoma indiferenciado de estómago HGC-27.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los inventores han identificado que la inhibición de la expresión de PIAS2β en células de carcinoma anaplásico de tiroides, y en células de carcinoma pobremente diferenciado de tiroides, tiene un efecto citotóxico sobre dichas células e inhibe su proliferación. Además, la administración de un inhibidor de la expresión de PIAS2β a un modelo de ratón de carcinoma anaplásico reduce el crecimiento del tumor.

1- Ácido nucleico de la invención.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos antisentido complementaria a una región diana del ARNm PIAS2β, en el que la unión del ácido nucleico a su secuencia diana produce la inhibición de la expresión del ARNm PIAS2β.

La expresión "secuencia nucleotídica", "ácido nucleico", "polinucleótido" se usan indistintamente en la presente invención para referirse a la forma polimérica del éster fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o deoxi ribonucleósidos (deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxitimidina o deoxicitidina; "moléculas de ADN") o cualquier análogo fosfoéster de los mismos tales como fosforotioatos y tioésteres, en forma de hebra sencilla o de doble hebra. Así, son posibles las hélices formadas por ADN-ADN, ADN -ARN y ARN-ARN. El término "secuencia de ácidos nucleicos" o "ácido nucleico" y, en particular, la molécula de ADN o ARN, se refiere únicamente a la estructura primaria o secundaria de la molécula y no limita a ningún tipo particular de estructura terciaria. Así, este término engloba ADN o ARN monocatenario o bicatenario (o de doble cadena), tal y como aparece en moléculas de ADN lineales o circulares, plásmidos ADN superenrrollado y cromosomas, o moléculas de ARN de interferencia.

La expresión "ácido nucleico que comprende una secuencia" hace referencia a una molécula de ácidos nucleicos que comprende o consiste en una secuencia nucleotídica concreta, tal y como se ha definido justo arriba. Dicho ácido nucleico puede ser de cadena simple o monocatenario, o de doble cadena o bicatenario.

"Ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos antisentido", o "ácido nucleico antisentido" tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un ácido nucleico que comprende, comprende sustancialmente o consiste en una secuencia antisentido, y que es monocatenario o bicatenario. En el caso de que sea monocatenario, el ácido nucleico consiste en una única cadena nucleotídica que comprende, comprende sustancialmente o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido, y preferiblemente se denomina "oligonucleótido antisentido". En caso de que el ácido nucleico sea bicatenario, además de comprender una primera cadena de nucleótidos que comprende, comprende sustancialmente o consiste en una secuencia antisentido, comprende una segunda cadena complementaria a la primera. En una realización preferida, dicha segunda cadena comprende una secuencia sentido complementaria a la secuencia antisentido comprendida en la primera cadena de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos de la invención que comprenden la secuencia antisentido pueden consistir en 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos de longitud.

"Secuencia de nucleótidos antisentido", "secuencia nucleotídica antisentido" o "secuencia antisentido", tal y como se usa en la presente invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida con, o es complementaria a, una secuencia diana monocatenaria (ARN o ADN) específica en sentido 3'-5'. En este caso, la secuencia antisentido es complementaria a una región del ARNm que codifica para PIAS2β, que comprende o consiste en la secuencia diana, o una variante funcionalmente equivalente de dicha región o secuencia (secuencia diana). La secuencia antisentido puede ser complementaria a una región codificante completa o a una región de la misma de un ARNm concreto, o a una región 5' o 3' no traducidas del mismo, o una región que incluye la región codificante y una secuencia de la región 5' o 3' no traducida del mismo. En una realización particular, la secuencia antisentido es complementaria a la secuencia diana en al menos un 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55; 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,85%, 90%, 95%, 7%, 99%, 99,9%, 99,99%, 100% de sus nucleótidos. Los métodos utilizados para calcular el porcentaje de complementariedad entre secuencias se describen en la definición de "secuencia complementaria".

En una realización particular, el porcentaje de complementariedad entre las dos secuencias se calcula con respecto a la totalidad de la secuencia antisentido. En una realización particular, se calcula con respecto a la totalidad de la secuencia diana. En otra realización particular, se calcula con respecto a la totalidad de la secuencia antisentido, o de la secuencia diana.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener por síntesis química o por reacciones de unión enzimática ampliamente conocidos para una persona experta en la técnica. Se describe la capacidad de derivar una secuencia nucleotídica antisentido, basada en una secuencia de ADNc correspondiente al ARNm que codifica una proteína determinada en, por ejemplo, en Stein y Cohen, Cancer Res. 48:2659, (1988) y van der Krol et al., BioTechniques 6:958, (1988).

Un ácido nucleico antisentido, un oligonucleótido antisentido o una secuencia antisentido, puede contener además nucleótidos modificados que aumentan su estabilidad biológica o la estabilidad de los complejos de ARN-ARN o ADN-ARN bicatenarios formados entre la secuencia nucleotídica antisentido y la secuencia de ácidos nucleicos diana, o entre la secuencia antisentido del ácido nucleico y la secuencia sentido en caso de ácidos nucleicos bicatenarios, tales como derivados de fosforotioato, ácidos nucleicos

peptídicos y oligonucleótidos de acridina-sustituido. Los ácidos nucleicos modificados que se pueden usar para la preparación de ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetil-Citosina, 5 -(carboxihidroxilmetil) uracilo, 5-carboxymethylaminomethyl -2-tiouridina, uracilo 5-carboximetil-aminometil, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3 - metilcitosina, 5-methylcitosine, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, uracilo -5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2 - tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracilo-5-oxiacético, 5-metil-2-tiouracilo , 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede ser producido biológicamente utilizando un vector de expresión en el que el ácido nucleico antisentido orientado ha sido clonado.

Alternativamente, el ácido nucleico puede comprender en cualquiera de las cadenas que comprende la secuencia antisentido y/o sentido del mismo, una o más de las siguientes modificaciones en uno o más residuos del esqueleto de ácidos nucleicos: modificaciones del azúcar en 2' tal como 2'-O-metil (2'-OMe), 2'-O-metoxietil (2'-MOE), 2'-O-metoxietoxi, 2'- fluoro (2'-F), 2'-allil, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetil], 2'-O-(N-metilcarbamato); modificaciones del azúcar en 4' incluyendo 4'-tio, puente 4'-CH2-O-2', puente 4-(CH2)2-O-2'; ácido nucleico cerrado (LNA, locked nucleic acid); ácido péptido nucleico (APN); ácido nucleico intercalante (INA); ácido nucleico intercalante enrollado (TINA); ácidos nucleicos de hexitol (HNA); ácido arabinonucleico (ANA); ácidos ciclohexano nucleicos (CNA); ácido ciclohexenilnucleico (CeNA); ácido treosil nucleico (TNA); oligonucleótidos morfolinos; Gap-meros; Mix-meros; incorporación de péptidos ricos en arginina; adición de 5'-fosfato a ARN sintéticos; aptámeros de ARN (Que-Gewirth NS, Gene Ther. 2007 Feb;14(4):283-91.); aptámeros de ARN regulados con antídotos en el sujeto del aptámero de ARN específico (Oney S., Oligonucleotides. 2007 Fall; 17(3):265-74) o cualquier combinación de los mismos.

Las modificaciones a uno o más enlaces de nucleósidos de los ácidos nucleicos pueden comprender una o más de las siguientes: fosforotioato, fosforamidato,

fosforodiamidato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato y fosforanilidato, o cualquier combinación de los mismos.

"Una secuencia de nucleótidos sentido", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia capaz de hibridar, o complementaria, a la secuencia antisentido. En una realización preferida, la secuencia sentido es aquella cuya secuencia es complementaria a la secuencia antisentido en todos sus nucleótidos, es decir en la que todos los nucleótidos son complementarios a todos los nucleótidos de toda o una parte de la secuencia antisentido. Al igual que la secuencia antisentido, la secuencia sentido puede estar compuesta por ARN o ADN. Puede consistir en 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos de longitud. En una realización particular, está compuesta por el mismo número de nucleótidos que la secuencia antisentido. En otra realización particular, está compuesta por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más nucleótidos que la secuencia antisentido. En otra realización particular, contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más, nucleótidos menos que la secuencia antisentido.

El término "complementario" incluye dentro de su alcance secuencias de ácido nucleico que son "completamente complementarias", "sustancialmente complementarias" o "parcialmente complementarias". Como se usa en el presente documento, el término "completamente complementario" indica que el 100 por ciento de los nucleótidos en un polinucleótido pueden participar en el emparejamiento de bases con otro polinucleótido. El término "sustancialmente complementario", como se usa en el presente documento, indica que al menos aproximadamente el 65 por ciento, 70 por ciento, 75 por ciento, 80 por ciento, 85 por ciento, 90 por ciento, 95 por ciento, 96 por ciento, 97 por ciento, 98 por ciento o 99 por ciento de los nucleótidos en un polinucleótido particular pueden participar en el emparejamiento de bases con otro polinucleótido. Como se usa en el presente documento, el término "parcialmente complementario" indica que al menos aproximadamente el 50 por ciento, el 55 por ciento o el 60 por ciento de los nucleótidos en un polinucleótido particular pueden participar en el emparejamiento de bases con otro polinucleótido

Las realizaciones particulares y preferidas indicadas en la definición de "una secuencia capaz de hibridar" a una segunda secuencia, o "una secuencia complementaria" a una segunda secuencia se aplican a la secuencia sentido, en las que la primera secuencia es la secuencia sentido y la segunda secuencia es la secuencia antisentido.

"Una secuencia capaz de hibridar" a una segunda secuencia, o "una secuencia complementaria" a una segunda secuencia, tal y como se usa en la presente invención, hace referencia a una secuencia, preferiblemente denominada primera secuencia, que comprende un número suficiente de nucleótidos complementarios a los nucleótidos de la segunda secuencia, de manera que forman una secuencia nucleotídica bicatenaria. Una secuencia que hibrida a una segunda secuencia es aquella capaz de hibridar con la segunda secuencia en condiciones poco restrictivas, medianamente restrictivas, o altamente restrictivas.

En una realización particular, condiciones típicas de hibridación altamente restrictivas incluyen la incubación en 6 X SSC (1 X SSC: NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M) y formamida al 40% a 42 0C durante 14 horas, seguido de uno o varios ciclos de lavado usando 0,5 X SSC, SDS al 0,1% a 600C. Alternativamente, condiciones altamente restrictivas incluyen aquellas que comprenden una hibridación a una temperatura de aproximadamente 50°-55° C en 6XSSC y un lavado final a una temperatura de 68° C en 1-3 X SSC. Las condiciones restrictivas moderadas comprenden la hibridación a una temperatura de aproximadamente 50° C hasta unos 65° C en NaCl 0,2 o 0,3 M, seguida de lavado a aproximadamente 50° C hasta unos 55° C en 0,2X SSC, SDS 0,1% (sulfato de dodecilo y sodio). En general una hibridación poco restrictiva es una hibridación realizada a 40ºC en 10xSSC, o en una solución equivalente.

Alternativamente, métodos para determinar la capacidad de una primera secuencia de hibridar con una segunda secuencia se han descrito, entre otros, en Pearson W.R. (Curr Protoc Bioinformatics. 2013 Jun; 0 3: 10.1002/0471250953.bi0301s42. doi: 10.1002/0471250953.bi0301s42), Pervouchine, D.D. (RNA. 2014 Oct; 20(10): 1519–1531. doi: 10.1261/rna.045088.114), Xie et al. (BMC Biol. 2019; 17: 62. doi: 10.1186/s12915-019-0679-8) o Elliot et al. (Nat. Commun. 2019; 10: 3401). Existen distintos algoritmos que permiten determinar la temperatura de fusión del híbrido formado por una primera y una segunda secuencia como, por ejemplo, el algoritmo Oligo Calc, accesible en http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html.

En una realización preferida, la secuencia capaz de hibridar con una segunda secuencia, preferiblemente denominada primera secuencia, es aquella cuya secuencia es complementaria a la segunda secuencia en todos sus nucleótidos, es decir en la que todos los nucleótidos son complementarios a todos los nucleótidos de toda o parte de la segunda secuencia. En una realización preferida, la secuencia complementaria a la segunda

secuencia, preferiblemente denominada primera secuencia, es complementaria en al menos un 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55; 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,85%, 90%, 95%, 7%, 99%, 99,9%, 99,99%, 100% de sus nucleótidos.

En una realización particular, el porcentaje de complementariedad entre la primera secuencia, o la secuencia complementaria, y la segunda secuencia se calcula con respecto a la totalidad de la secuencia de la primera secuencia. En una realización particular, se calcula con respecto a la totalidad de la secuencia de la segunda secuencia. En otra realización particular, se calcula con respecto a la totalidad de la secuencia de la primera secuencia, o de la segunda secuencia.

En una realización particular, los métodos para calcular el porcentaje de complementariedad entre dos secuencias, i.e. entre una primera secuencia complementaria a una segunda secuencia, son conocidos por un experto en la técnica, teniendo en cuenta que para una secuencia de ARN los uracilos con complementarios a las adeninas, y viceversa, y las citosinas a las guaninas, y viceversa. Al calcular la complementariedad para una secuencia de ADN, las timinas son complementarias a las adeninas, y viceversa, y las citosinas a las guaninas, y viceversa. En este sentido, se puede calcular el porcentaje de complementariedad de manera que el porcentaje de complementariedad "X" de una primera secuencia a una segunda secuencia es 100x(Y/Z), donde Y es el número de nucleótidos que son complementarios a los de la segunda secuencia (identificados visualmente, es decir a mano, o utilizando un algoritmo especifico), y Z es el número total de nucleótidos, o la longitud, de la segunda secuencia. En una realización particular, en caso de que la longitud de las dos secuencias sea diferente, se calcula con respecto a la longitud de la región de cada una de las secuencias que muestra complementariedad.

La expresión "secuencia diana", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de nucleótidos de interés. En el caso particular de la presente invención la secuencia diana es una secuencia del ARNm PIAS2β. Por región diana se entiende la zona en donde está la secuencia diana.

La expresión "inhibición de la expresión del ARNm PIAS2β" se refiere en la presente invención a la disminución de la expresión de ARNm PIAS2β en una célula, es decir, una disminución en la traducción de dicho ARNm. Dicha reducción se puede deber a una inhibición de la traducción de dicho ARNm en concreto o a una degradación de los ARNm PIAS2β presentes en la célula, o incluso a una reducción en la síntesis de dichos ARNm por

la célula. Los procedimientos adecuados para determinar si se ha producido una inhibición de la expresión del ARNm PIAS2β incluyen, sin limitación, los ensayos estándar para determinar los niveles de expresión de ARNm tales como qPCR, RT-PCR, análisis de protección de ARN, análisis de bandas Northern, inmunotransferencia de ARN, hibridación in situ, tecnología de micromatrices, procedimientos basados en marcas tales como análisis en serie de la expresión génica (SAGE) incluyendo variantes tales como LongSAGE y SuperSAGE, micromatrices, hibridación in situ con fluorescencia (FISH), incluyendo variantes tales como Flow-FISH, qFISH y FISH de doble fusión (D-FISH), y similares. También incluyen ensayos destinados a determinar la cantidad de proteína PIAS2β expresada en una célula como indicación indirecta del nivel de traducción del ARNm PIAS2β. Dichos ensayos incluyen la cuantificación de la proteína presente en una célula, grupo de células, o extracto celular, por medio de procedimientos convencionales, por ejemplo, usando anticuerpos con una capacidad para unirse específicamente a las proteínas codificadas por el gen de PIAS2β (o a fragmentos del mismo que contienen determinantes antigénicos) y la posterior cuantificación de los complejos anticuerpo-antígeno resultantes. Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos que se pueden usar en la presente invención, que usan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios); entre estas técnicas se incluyen bandas western o transferencia western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitiva (inmunoensayo enzimático), DAS-ELISA (ELISA de tipo sándwich de doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas y de inmunohistoquímica, técnicas basadas en el uso de biochips o micromatrices de proteína incluyendo anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otras formas de detectar y cuantificar los niveles de la proteína de interés incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

En una realización particular, la inhibición del ARNm PIAS2β consiste en reducir la cantidad de ARNm PIAS2β en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 90 %, o en un 100%, y todos los intervalos entre un 5 % y un 100 % respecto de un valor de referencia. En otra realización particular, la inhibición del ARNm PIAS2β consiste en reducir la traducción del ARNm PIAS2β en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %,

al menos un 90 %, o en un 100%, y todos los intervalos entre un 5 % y un 100 % respecto de un valor de referencia.

En una realización particular, el valor de referencia es aquel medido en ausencia del ácido nucleico de la invención.

En una realización preferida, la inhibición del ARNm PIAS2β de las realizaciones anteriores, se refiere a la inhibición del ARNm de una célula, grupo de células, extracto celular, tejido, extracto de células de un tejido, preferiblemente en el que las células o el tejido son de la glándula tiroides, más preferiblemente del tejido folicular de la glándula tiroides, aún más preferiblemente de un tumor del tejido folicular de la glándula tiroides, incluso más preferiblemente de un carcinoma del tejido folicular de la glándula tiroides, incluso aún más preferiblemente, de un carcinoma seleccionado del grupo que consiste en un carcinoma anaplásico, carcinoma pobremente diferenciado y un carcinoma recurrente de la glándula tiroides. En una realización aún más preferida, la inhibición del ARNm PIAS2β de las realizaciones anteriores, se refiere a la inhibición del ARNm de una célula, grupo de células, extracto celular, tejido, extracto de células de un tejido, preferiblemente en el que las células o el tejido son de un carcinoma anaplásico o pobremente diferenciado de la glándula tiroides, preferiblemente de un carcinoma anaplásico de la glándula tiroides.

En una realización particular, la inhibición del ARNm PIAS2β de las realizaciones anteriores, se refiere a la inhibición de ARNm PIAS2β extraído de la célula, grupo de células, extracto celular, tejido, extracto de células del tejido indicados en cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización particular, el ácido nucleico de la invención inhibe de manera específica la expresión de PIAS2β. La expresión "inhibe de manera específica la expresión del ARNm PIAS2β", o "inhibición específica de la expresión del ARNm PIAS2β", se refiere a la inhibición del ARNm PIAS2β, tal y como se ha definido arriba y según cualquiera de las realizaciones particulares y preferidas indicadas arriba, en la que además, se inhibe la expresión del ARNm PIAS2β sin inhibir la expresión de una proteína diferente a PIAS2β, como puede ser una isoforma PIAS2 diferente de PIAS2β, como puede ser PIAS2α, o del ARNm que codifica una proteína diferente de PIAS2β, incluso una isoforma PIAS2 diferente de PIAS2β, como puede ser PIAS2α.

El término "PIAS2" hace referencia en la presente invención a las diferentes isoformas de la proteína PIAS2 (de sus siglas en inglés "*protein inhibitor of activated STAT*

2"), implicadas en la sumoilación de diferentes proteínas, como pueden ser PARK7, MDM2, o NCOA2. Las isoformas de PIAS2 referidas en la presente invención son PIAS2β, PIAS2α, y la isoforma 8 de PIAS2, también conocida como PIAS2 NY.

El término "PIAS2α", "PIAS2a" "proteína PIAS2α" o "isoforma PIAS2α" hace referencia en la presente invención a la isoforma α de PIAS2, implicada en la sumoilación específica de diferentes proteínas.. La proteína PIAS2α de la presente invención tiene número de identificación O75928-2 en la base de datos Uniprot, en la versión disponible del 5 de mayo 2009, y está codificada por el ARNm con número de identificación ENST00000324794.11 en la versión 97 de julio 2019 de la base de datos ENSEMBL (EMBL-EBI).

La expresión "ARNm PIAS2α", "ARNm PIAS2a", "ARNm de la proteína PIAS2α", o "ARNm que codifica la proteína PIAS2α", hace referencia en la presenta invención al ARNm cuya secuencia codifica la proteína PIAS2α de la invención, definida justo arriba y cuya traducción da lugar a la proteína PIAS2β. Dicho ARNm tiene número de identificación ENST00000324794.11 en la versión 97 de julio 2019 de la base de datos ENSEMBL (EMBL-EBI). Este ARNm está formado por 13 exones.

El término "PIAS2β", "PIAS2b", "proteína PIAS2β", o "isoforma PIAS2β" hace referencia en la presente invención a la isoforma β de la proteína PIAS2, implicada específicamente en la sumoilación de diferentes proteínas, ejemplos no limitantes de dichas proteínas son la proteína MDM2, o la proteína NCOA2. La proteína PIAS2β de la presente invención tiene número de identificación O75928-1 en la base de datos Uniprot, en la versión disponible el 5 de mayo 2009, y está codificada por el ARNm con número de identificación ENST00000585916.6 en la versión 97 de julio 2019 de la base de datos ENSEMBL (EMBL-EBI).

La expresión "ARNm PIAS2β", "ARNm PIAS2b", "ARNm de la proteína PIAS2β" o "ARNm que codifica la proteína PIAS2β" hace referencia en la presente invención al ARNm cuya secuencia codifica la proteína de PIAS2β de la invención, definida justo arriba y cuya traducción da lugar a la proteína PIAS2β. Dicho ARNm tiene número de identificación ENST00000585916.6 en la versión 97 de Julio 2019 de la base de datos ENSEMBL. Este ARNm está formado por 14 exones.

El término "isoforma 8 de PIAS2", o "PIAS2 NY" hace referencia en la presente invención a la isoforma 8, o NY de la proteína PIAS2, con número de identificación

NP_001310988.1 en la base de datos NCBI, en la versión de 31 de mayo de 2019 y codificada por el ARNm con número de identificación ENST00000592212.5 en la versión 97 de julio 2019 de la base de datos ENSEMBL (EMBL-EBI).

La expresión "ARNm PIAS2 isoforma 8", "ARNm PIAS2 NY", "ARNm de la proteína PIAS2 isoforma 8", "ARNm de la proteína PIAS2 NY", "ARNm que codifica la proteína PIAS2 isoforma 8" o "ARNm que codifica la proteína PIAS2 NY", hace referencia en la presente invención al ARNm cuya secuencia codifica la proteína de PIAS2 isoforma 8 o PIAS2 NY de la invención, definida justo arriba y cuya traducción da lugar a la proteína PIAS2 isoforma 8 o PIAS2 NY. Dicho ARNm tiene número de identificación ENST00000592212.5 en la versión 97 de julio 2019 de la base de datos ENSEMBL (EMBL-EBI). Este ARNm está formado por 12 exones.

En una realización particular, la secuencia diana del ácido nucleico de la invención se localiza en el exón 14 del ARNm de PIAS2β.

En otra realización particular de la invención, la secuencia diana del ácido nucleico de la invención, se selecciona del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO. 1-5, y secuencias funcionalmente equivalentes. En una realización preferida, la secuencia diana del ácido nucleico de la invención es SEQ ID NO. 1 o una secuencia funcionalmente equivalente.

La expresión "secuencia funcionalmente equivalente", "secuencias funcionalmente equivalentes" o "variante funcionalmente equivalente" tal y como se usa en la presente invención, se refiere a secuencia/s que resulta/n de la inserción, deleción y/o substitución de uno o varios nucleótidos en las secuencias de referencia, es decir, en las secuencias a las que es/son funcionalmente equivalentes. En una realización particular, resulta de la inserción, deleción y/o substitución de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 910, 12, 15, 20, 25 nucleótidos en las secuencias de referencia.

En una realización preferida la secuencia variante funcionalmente presenta una identidad de secuencia de al menos un 50%, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65%, menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99% con la secuencia de referencia.

En una realización preferida, la identidad de la secuencia se determina a lo largo de toda la longitud de la secuencia de referencia. En otra realización la identidad de secuencia se determina en la totalidad de longitud de la variante, preferiblemente de la variante funcionalmente equivalente.

Los términos "identidad", “identidad de secuencia”, "idéntica" o "porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más secuencias de nucleótidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo espacios, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar las sustituciones conservativas de aminoácidos como parte de la identidad de la secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir utilizando un software o algoritmos de comparación de secuencias o por medios visuales. En la técnica se conocen diversos algoritmos y software que pueden usarse para obtener alineamientos de secuencias de nucleótidos.

El porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación. Las secuencias alineadas pueden ser secuencias polinucleotídicas o secuencias polipeptídicas. Para el alineamiento óptimo de las dos secuencias, la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender inserciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende inserciones o deleciones). El porcentaje de identidad de secuencia se calcula determinando el número de posiciones en las que ocurren los residuos de nucleótidos idénticos en ambas secuencias comparadas para obtener el número de posiciones coincidentes, luego dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. En una realización particular, la identidad de secuencia entre dos secuencias de polipéptidos o dos secuencias de polinucleótidos se puede determinar, por ejemplo, utilizando el programa del National Center for Biotechnology Information, NCBI, de E.E. U.U. en Bethesda, Maryland (U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA) disponible para la comunidad científica de forma gratuita en la conexión web (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) y que utiliza el algoritmo conocido como Basic Local Alignment Search Tool (acrónimo BLAST, marca registrada de la U.S. National Library of Medicine). El algoritmo BLAST tiene

distintos índices que te indican cómo de idéntica o disimilar es una secuencia bien por su composición o por el orden de sus elementos. BLAST tiene una sección específica, entre otras, para nucleótidos de cadena corta "Nucleotide BLAST" (BLASTn), otra sección específica para péptidos y proteínas "Protein BLAST" (BLASTp).".En una realización particular, la identidad de secuencia entre dos secuencias de polipéptidos se puede determinar utilizando el programa BLAST (en particular BLASTp) o el programa Gap en la versión 10.0-UNIX de WISCONSIN PACKAGE de Genetics Computer Group, Inc., basado en el método de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970) utilizando el conjunto de parámetros predeterminados para la comparación por pares (para la comparación de secuencias de aminoácidos: Pena de creación de brecha = 8, Pena de extensión de brecha = 2; para la comparación de secuencias de nucleótidos: Pena de creación de brecha = 50; Brecha Extensión Penalty = 3), o usando el programa TBLASTN en el paquete de software BLAST 2.2.1 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402), usando la matriz BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919, 1992) y el conjunto de parámetros predeterminados para la comparación por pares (costo de creación de brecha = 11, costo de extensión de brecha = 1).

Alternativamente, se puede determinar el grado de identidad entre dos secuencias empleando el algoritmo ENSEML tal y como se describe en https://www.ensembl.org/info/docs/index.html y https://es.wikipedia.org/wiki/Ensembl

En otra realización particular, el porcentaje de identidad de secuencia entre los polinucleótidos o las secuencias de ácidos nucleicos, y sus funciones correspondientes se puede determinar, por ejemplo, utilizando una variedad de algoritmos de búsqueda basados en homología que están disponibles para comparar una secuencia de interés, con una base de datos de secuencias nucleotídicas, incluyendo por ejemplo, BLAST (en particular BLASTN), FASTA, CLUSTAL OMEGA, EMBOSS Needle, EMBOSS Stretcher, o ENSEMBL.. El porcentaje de identidad se refiere al porcentaje de residuos de nucleótidos idénticamente emparejados que existen a lo largo de la porción de las secuencias que está alineada por el algoritmo BLAST. Al utilizar el programa BLAST, en una realización particular, de entre los diferentes alineamientos proporcionados por el programa, se escoge el alineamiento que da un mayor valor de identidad de secuencia. Se considera un porcentaje de identidad de secuencia alto, o una coincidencia "alta entre las secuencias analizadas si el

porcentaje de identidad de secuencia es de al menos el 70%; un porcentaje de identidad de secuencia medio se considera del 35% al 70%; y un porcentaje de identidad de secuencia bajo se considera de menos del 35%. En una realización preferida, la identidad de la secuencia se determina a lo largo de toda la longitud de la secuencia de referencia. En otra realización la identidad de secuencia se determina con respecto a la totalidad de longitud de la variante, preferiblemente de la secuencia funcionalmente equivalente. En otra realización particular, la identidad de secuencia se determina respecto de la totalidad de la longitud de la secuencia de referencia o de la secuencia funcionalmente equivalente.

En una realización particular, las definiciones y las realizaciones particulares indicadas en la definición de “secuencia funcionalmente equivalente” y en “porcentaje de identidad" se aplican a las secuencias funcionalmente equivalentes a la secuencia diana del ARNm PIAS2β, donde la secuencia de referencia es la secuencia diana del ARNm PIAS2β, preferiblemente las secuencias SEQ ID NO 1-5, más preferiblemente la secuencia SEQ ID NO.1. Métodos que permiten medir la identidad de secuencia de una secuencia se han indicado más arriba en la definición de "identidad", "idéntica" o "porcentaje de identidad".

Preferiblemente, las secuencias diana funcionalmente equivalentes son aquellas cuya secuencia les permite hibridar en condiciones altamente restrictivas con el ácido nucleico antisentido de la invención. Condiciones típicas de hibridación altamente restrictivas se han indicado más arriba en la definición de “secuencias capaz de hibridar”.

En una realización particular, la secuencia funcionalmente equivalente mantiene la función de la secuencia de referencia, preferiblemente la secuencia a la que es funcionalmente equivalente, en al menos en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, un 100%, 120%, 150%, 180%, 200%, 250%, 300% , 350%, 400% o más.

En el caso de la secuencia funcionalmente equivalente a la secuencia diana del ARNm PIAS2β, preferiblemente a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO. 1-5, la función que mantienen es la de dichas secuencias diana. En una realización particular, la función de dichas secuencias es el codificar una región de la proteína PIAS2β funcional. Por tanto, la función de la proteína PIAS2β codificada por el ARNm que no tiene dichas secuencias, se ve afectada. Por tanto, los procedimientos adecuados para determinar si una secuencia mantiene la función de las secuencias diana en el ARNm PIAS2β, pueden consistir en determinar si un ARNm que no contenga dichas

secuencias funcionalmente equivalentes mantiene la capacidad de sumoilación de PIAS2β. Ejemplo no limitantes de métodos que permiten determinar si una proteína mantiene la capacidad de SUMOilación de PIAS2β incluyen determinar su capacidad de SUMOilación de la proteína MDM2, NCOA2 y/o MDA5, empleando ensayos ampliamente conocidos tal y como los descritos en El Motiam A. et al, FASEB Journal, 2019, 33:643-651).

En una realización preferida, el ácido nucleico de la invención se selecciona del grupo que consiste en un ácido nucleico bicatenario de interferencia de ARN, un oligonucleótido antisentido, un gapmero, un APN, un LNA, un INA, un HNA, un morfolino, una ribozima y un aptámero.

En una realización preferida, el ácido nucleico de la invención se selecciona del grupo que consiste en un ARN interferente pequeño (ARNip), un ARN horquillado corto (ARNhc) y un micro ARN(miARN).

En una realización preferida, el ácido nucleico de la invención es un ARN interferente pequeño.

"Ácido nucleico bicatenario de interferencia de ARN", "Ácido nucleico bicatenario", tal y como se usa en la presente invención, hace referencia a un ácido nucleico bicatenario, es decir compuesto por dos cadenas de ácidos nucleicos que hibridan, o que son complementarias, y que inducen la vía de interferencia de ARN. En una realización preferida, el ácido nucleico de la invención comprende una primera cadena que comprende, comprende sustancialmente o consiste en una secuencia sentido y una segunda cadena que comprende, comprende sustancialmente o consiste en una secuencia antisentido, En una realización particular, los ácido nucleicos bicatenarios de interferencia de la presente invención, incluyen los ácido nucleicos bicatenarios que consisten o dan lugar a un ARN interferente pequeño (ARNip), ARN horquillado corto (ARNhc) o un micro ARN (miARN). Las realizaciones particulares indicadas en la definición de "una secuencia capaz de hibridar" a una segunda secuencia, o "una secuencia complementaria" se aplican al "ácido nucleico bicatenario de interferencia de ARN", en el que la primera secuencia es aquella que comprende la secuencia sentido y la segunda secuencia es aquella que comprende la secuencia antisentido.

El término ARN interferente pequeño ("ARNip") se refiere a dúplex de ARN inhibidores pequeños que inducen la vía de interferencia de ARN. Estas moléculas pueden variar en longitud (generalmente de 18-30 pares de bases) y contienen grados variables de

complementariedad a sus ARNm diana en la cadena antisentido. Algunos ARNip, pero no todos, tienen bases no apareadas sobresalientes en el extremo 5' ó 3' de la hebra sentido y/o la hebra antisentido. El término "ARNip" incluye dúplex de dos cadenas separadas. Como se usa aquí, las moléculas de ARNip no están limitadas a moléculas de ARN sino que abarcan además ácidos nucleicos con uno o más nucleótidos químicamente modificados, tales como morfolinos.

El término "ARNhc" o "ARN horquillado corto" como se usa aquí, se refiere a un ARNbc donde las dos cadenas están unidas por una cadena sin interrumpir de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva para formar una estructura dúplex.

El término "micro ARN" o "miARN" se refiere a moléculas de ARN monocatenario cortas, típicamente de alrededor de 21-23 nucleótidos de longitud capaces de regular la expresión génica. Los miARN pueden ser sintéticos (es decir, recombinantes) o naturales. Los miARN naturales están codificados por genes que se transcriben del ADN y se procesan de transcritos primarios ("pri-miARN") a estructuras cortas de tallo-bucle ("pre-miARN") y por último a miARN maduro. Las moléculas de miARN maduras son parcialmente complementarias a una o más moléculas de ARNm y disminuyen la expresión génica a través de un proceso similar a la interferencia de ARN o inhibiendo la traducción del ARNm.

La expresión "oligonucleótido antisentido" se ha definido más arriba, en relación al ácido nucleico que comprende una secuencia antisentido.

Como se usa aquí, el término "ribozima" o "enzima de ARN" o "ARN catalítico" se refiere a una molécula de ARN que cataliza una reacción química. Muchas ribozimas naturales catalizan la hidrólisis de uno o más sus propios enlaces fosfodiéster o la hidrólisis de enlaces en otros ARN, pero también se ha encontrado que catalizan la actividad aminotransferasa del ribosoma, la actividad ligasa de una ADN ligasa y un número de otras reacciones químicas realizadas por enzimas proteicas convencionales.

Un "aptámero" como se usa aquí, se refiere a un ligando de ácido nucleico que se une a más de un sitio en una molécula diana donde la unión no es "complementaria", es decir, no se debe a la formación de pares de bases entre un ligando ácido nucleico y una secuencia diana de ácido nucleico. Se puede diseñar un aptámero que se una a cualquier diana previsible, incluyendo polipéptidos. Los aptámeros ofrecen la utilidad para las aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas ya que ofrecen propiedades de reconocimiento

molecular que rivalizan con la de la biomolécula normalmente usada, anticuerpos. Además de su reconocimiento selectivo, los aptámeros ofrecen ventajas sobre los anticuerpos ya que se pueden manipular completamente en un tubo de ensayo y se producen fácilmente mediante síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables y provocan poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas. Los aptámeros se pueden sintetizar mediante rondas repetidas de reparto in vitro, selección y amplificación, una metodología conocida en el estado de la técnica como "SELEX" (siglas en inglés de evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) (Shamah et al, Acc. Chem. Res. 2008, 41 pp. 130-8). De forma alternativa, se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante fase sólida paso a paso.

Un ácido nucleico cerrado (LNA), con frecuencia denominado ARN inaccesible, es un nucleótido de ARN modificado. El grupo ribosa de un nucleótido LNA se modifica con un puente extra que une los carbonos 2' y 4' (puente O2',C4'-metileno). El puente "cierra" la ribosa en la conformación estructural 3'-endo, que con frecuencia se encuentra en la forma A del ADN o ARN. Los nucleótidos LNA se pueden mezclar con bases de ADN o ARN en el ácido nucleico cuando se desee. Tales oligómeros están comercialmente disponibles. La conformación cerrada de la ribosa aumenta el apilamiento de bases y pre-organización del esqueleto. Esto aumenta significativamente la estabilidad térmica (temperatura de fusión) y la afinidad de hibridación de ácidos nucleicos modificados con LNA, además de tener capacidades mejoradas en la discriminación a malos emparejamientos. Estas propiedades los hacen muy útiles para técnicas antisentido. Además, los oligonucleótidos LNA anti-miR se han probado en primates con resultados esperanzadores y baja toxicidad.

Un ácido péptido nucleico (APN) es un polímero artificialmente sintetizado similar a ADN o ARN y se usa en investigación biológica y tratamientos médicos. No se sabe que el APN se produzca de forma natural. EL ADN y ARN tienen un esqueleto de azúcar de desoxirribosa y ribosa, respectivamente, mientras que el esqueleto de APN está compuesto de unidades repetitivas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos. Las diferentes bases de purina y pirimidina están unidas al esqueleto por enlaces metilen-carbonilo. Los APN se representan como péptidos, con el N-terminal en la primera posición (izquierda) y el C-terminal a la derecha. Puesto que el esqueleto del APN no contiene grupos fosfato cargados, la unión entre las hebras APN/ADN es más fuerte que entre las hebras ADN/ADN debido a la falta de repulsión electrostática. Las moléculas de bases mezcladas

de APN son imitadores verdaderos de las moléculas de ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. La unión APN/APN es más fuerte que la unión APN/ADN.

Un ácido nucleico intercalante (INA) es un análogo de ácido nucleico modificado que comprende desoxirribonucleótidos normales unidos covalentemente a inserciones hidrofóbicas. El INA tiene una gran afinidad por el ADN complementario con estabilización de hasta 11 grados para cada modificación. El INA tiene mayor especificidad por una diana completamente apareada sobre dianas mal apareadas que el ADN normal. Utilizando que los INA tienen mayor afinidad por ADN hace posible usar sondas más cortas y aumentar así la especificidad incluso más. Además, un INA es un análogo oligonucleotídico selectivo de ADN, con una capacidad única para discriminar entre ADN y ARN. Incluso aunque los INA tienen altas afinidades para ADN complementario, tiene una menor afinidad por una secuencia de INA complementarios. Los ácidos nucleicos intercalantes enrollados se denominan TINA.

Los ácidos nucleicos de hexitol (HNA) son nucleótidos construidos de nucleobases naturales y un esqueleto 1,5-anhidrohexitol fosforilado. Las asociaciones moleculares entre HNA y ARN son más estables que entre HNA y ADN y entre ácidos nucleicos naturales (ADNbc, ARNbc, ADN/ARN). Otros oligonucleótidos sintéticamente modificados comprenden ANA (ácido arabinonucleico), CNA (ácidos ciclohexano nucleicos), CeNA (ácido ciclohenexilnucleico) y TNA (ácido treosilnucleico).

Los morfolinos son moléculas sintéticas que son el producto de un rediseño de la estructura natural del ácido nucleico. Estructuralmente, la diferencia entre morfolinos y ADN o ARN es que mientras los morfolinos tienen nucleobases estándar, esas bases están unidas a anillos de 6 miembros de morfolina en lugar de a anillos de desoxirribosa/ribosa y los enlaces fosforodiamidato no iónicos entre las subunidades reemplazan los enlaces fosfodiéster aniónicos. Los morfolinos se denominan algunas veces PMO (oligonucleótido fosforodiamidato de morfolino). El anillo de morfolina de 6 miembros tiene la fórmula química O-(CH2-CH2)2-NH.

Los gapmeros o “compuestos oligoméricos con huecos” son sondas oligonucleotídicas quiméricas de ARN-ADN-ARN, donde se insertan ventanas o ‘huecos’ (‘gaps’) de ADN en un oligonucleótido de ARN de otra manera normal o modificado conocidas como “alas”. Esta modificación aumenta la estabilidad del oligonucleótido in vivo y la avidez de la interacción de la sonda con la diana, de modo que se pueden usar sondas

más cortas de forma eficaz. Preferiblemente, las alas son oligonucleótidos 2'-O-metil (OMe) o 2'-O-metoxietil (MOE) modificados que protegen el bloque interno de la degradación por nucleasas. Además, los nucleótidos que forman el hueco o las alas pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster o por enlaces fosforotioato, que los hace así resistentes a la degradación por RNasa. Además, los nucleótidos que forman las alas también pueden estar modificados por incorporación de bases unidas por enlaces 3' metilfosfonato.

En una realización particular, la secuencia antisentido del ácido nucleico de la invención se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6-10 y secuencias funcionalmente equivalentes. En una realización preferida, la secuencia antisentido del ácido nucleico de la invención se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6-7 y variantes funcionalmente equivalentes, más preferiblemente es SEQ ID NO. 6 o variantes funcionalmente equivalentes.

En una realización particular, se aplican las definiciones y realizaciones particulares indicadas en la definición "secuencias funcionalmente equivalentes", así como en la definición "porcentaje de identidad de secuencia", a las secuencias funcionalmente equivalentes a SEQ ID NO. 6-10, donde la secuencia de referencia es la secuencia antisentido tal y como se ha definido anteriormente, preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6-10, más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6-7, aún más preferiblemente es SEQ ID NO. 6.

Métodos que permiten medir la identidad de secuencia de una secuencia se han indicado más arriba en la definición de "identidad", "idéntica" o "porcentaje de identidad".

En una realización particular, la secuencia funcionalmente equivalente a la secuencia antisentido del ácido nucleico de la invención, la secuencia funcionalmente equivalente mantiene la función de dicha secuencia, preferiblemente de la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6-10, más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6-7, aún más preferiblemente de la secuencia SEQ ID NO.6, en al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, un 100%, 120%, 150%, 180%, 200%, 250%, 300% , 350%, 400% o más. La función de la secuencia antisentido del ácido nucleico de la invención es hibridar con la secuencia diana del ARNm PIAS2β e inhibir la expresión del ARNm PIAS2β. Por tanto, los ensayos que permiten identificar las secuencias que mantienen la función de las secuencias antisentido corresponden a aquellos indicados más arriba para determinar si una secuencia

hibrida con una segunda secuencia, en este caso la secuencia diana en el ARNm PIAS2β correspondiente (ver definición de "secuencia capaz de hibridar", "secuencia complementaria" más arriba) y aquellos indicados arriba para determinar la inhibición de la expresión del ARNm PIAS2β (ver definición de "inhibición de la expresión del ARNm PIAS2β"). En una realización particular, la función que mantienen las secuencias funcionalmente equivalentes de la secuencia antisentido correspondiente, es la de hibridar con la secuencia diana correspondiente en el ARNm PIAS2β y/o la de inhibir la expresión del ARNm PIAS2β, en al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, un 100%, 120%, 150%, 180%, 200%, 250%, 300% , 350%, 400% o más.

En una realización particular, la secuencia antisentido del ácido nucleico de la invención es una secuencia de ADN equivalente a las secuencias antisentido de ARN definidas en las realizaciones anteriores. En una realización particular, las secuencias antisentido de los ácidos nucleicos de la invención se seleccionan del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID NO. 16-20. En una realización particular, la secuencia nucleotídica completa del ácido nucleico de la invención es una secuencia de ADN. En una realización particular, las realizaciones indicadas más arriba en relación a las secuencias antisentido seleccionadas del grupo SEQ ID NO. 6-10 se aplican también a las secuencias antisentido seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO. 16-20, modificando en dichas realizaciones las referencias a SEQ ID NO.6-10 por SEQ ID NO.16-20.

En otra realización particular, el ácido nucleico de la invención es bicatenario de interferencia de ARN y comprende además una secuencia de nucleótidos sentido, complementaria a la secuencia antisentido. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos antisentido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6-10 y secuencias funcionalmente equivalentes, y la secuencia sentido del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11-15 y secuencias funcionalmente equivalentes.

Las expresiones "ácido nucleico bicatenario de interferencia de ARN", y "secuencia de nucleótidos sentido" y "secuencias funcionalmente equivalentes a SEQ ID NO. 6-10" se han definido más arriba.

En una realización particular, las definiciones y realizaciones particulares indicadas en las definiciones de "secuencia funcionalmente equivalente" y de "porcentaje de identidad de secuencia" se aplican a las secuencias funcionalmente equivalentes a SEQ ID NO. 11-15,

donde la secuencia de referencia se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11-15, preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11-12, más preferiblemente con SEQ ID NO. 11. Métodos que permiten medir la identidad de secuencia de una secuencia se han indicado más arriba en la definición de "identidad", "idéntica" o "porcentaje de identidad".

En una realización particular, la secuencia funcionalmente equivalente a la secuencia sentido del ácido nucleico de la invención, la secuencia funcionalmente equivalente mantiene la función de dicha secuencia nucleotídica sentido, preferiblemente de la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11-15, más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11-12, aún más preferiblemente de la secuencia SEQ ID NO.11, en al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, un 100%, 120%, 150%, 180%, 200%, 250%, 300% , 350%, 400% o más. La función de la secuencia sentido del ácido nucleico de la invención es hibridar con la secuencia antisentido del ácido nucleico e inhibir la expresión del ARNm PIAS2β. Por tanto, los ensayos que permiten identificar las secuencias que mantienen la función de las secuencias sentido corresponden a aquellos indicados más arriba para determinar si una secuencia hibrida con una segunda secuencia, o es complementaria a una segunda secuencia, que en este caso sería la secuencia antisentido correspondiente del ácido nucleico de la invención (ver definición de “secuencia capaz de hibridar”, “secuencia complementaria” más arriba) y aquellos indicados arriba para determinar la inhibición de la expresión del ARNm PIAS2β (ver definición de “inhibición de la expresión del ARNm PIAS2β”). En una realización particular, la función que mantienen las secuencias funcionalmente equivalentes de la secuencia sentido correspondiente, es la de hibridar con la secuencia antisentido correspondiente y/o la de inhibir la expresión del ARNm PIAS2β una vez han hibridado con la secuencia antisentido correspondiente, en al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, un 100%, 120%, 150%, 180%, 200%, 250%, 300% , 350%, 400% o más.

En una realización particular, la secuencia sentido del ácido nucleico de la invención es una secuencia de ADN equivalente a las secuencias sentido de ARN definida en las realizaciones anteriores. En una realización particular, las secuencias sentido de los ácido nucleicos de la invención se seleccionan del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID NO. 21-25. En una realización particular, la secuencia nucleotídica completa del ácido

nucleico de la invención es una secuencia de ADN. En una realización particular, las realizaciones indicadas más arriba en relación a las secuencias sentido seleccionadas del grupo SEQ ID NO. 11-15 se aplican también a las secuencias sentido seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO. 21-25, modificando en dichas realizaciones las referencias a SEQ ID NO.11-15 por SEQ ID NO.21-25.

En una realización preferida, la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia antisentido según cualquiera de las realizaciones anteriores, comprende una secuencia de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 uracilos, preferiblemente al menos 2, más preferiblemente 2 uracilos en su extremo 3'. En una realización particular, la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia antisentido es de ADN y se aplica a dicha secuencia nucleotídica la realización anterior sustituyendo "uracilos" por "timinas".

En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia sentido según cualquiera de las realizaciones anteriores, comprende una secuencia de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 uracilos, preferiblemente 20, más preferiblemente al menos 2, aún más preferiblemente 2 uracilos en su extremo 3'. En una realización particular, la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia sentido es de ADN y se aplica a dicha secuencia nucleotídica la realización anterior sustituyendo "uracilos" por "timinas".

En otra realización preferida de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico bicatenario, en el que tanto la secuencia que comprende la secuencia antisentido según cualquiera de las realizaciones anteriores, y la secuencia que comprende la secuencia sentido según cualquiera de las realizaciones anteriores, comprende una secuencia de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 uracilos, , preferiblemente 20, más preferiblemente al menos 2, aún más preferiblemente 2 uracilos en su extremo 3'. En una realización particular, el ácido nucleico bicatenario es de ADN y se aplica a dicho ácido nucleico la realización anterior sustituyendo "uracilos" por "timinas".

En una realización particular, la secuencia del ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia antisentido y una secuencia de 2 uracilos en su extremo 3' según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 26-30 y secuencias funcionalmente equivalentes, preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 26-27 y secuencias funcionalmente equivalentes, aún más

preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 26 y secuencias funcionalmente equivalentes. En caso de que la secuencia sentido sea es de ADN, y se aplican todas las realizaciones anteriores dirigidas se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 36-40 y secuencias funcionalmente equivalentes, preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 36-37 y secuencias funcionalmente equivalentes, más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 36 y secuencias funcionalmente equivalentes.

En otra realización particular, la secuencia del ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia sentido que comprende dos uracilos en su extremo 3' según cualquiera de las realizaciones anteriores, se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 31-35 y secuencias funcionalmente equivalentes, preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 31-32 y secuencias funcionalmente equivalentes, aún más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 31 y secuencias funcionalmente equivalentes. En caso de que la secuencia sentido sea de ADN, se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 41-45 y secuencias funcionalmente equivalentes, preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 41-42 y secuencias funcionalmente equivalentes, más preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID NO. 41 y secuencias funcionalmente equivalentes.

La expresión "secuencias funcionalmente equivalente" en relación a variantes de la secuencias antisentido se ha definido más arriba y la definición y realizaciones particulares indicadas en relación a dichas variantes de las secuencias antisentido se aplican a las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO. 26-30 y a las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO. 36-40..

La expresión "secuencias funcionalmente equivalentes" en relación a variantes de la secuencia sentido se ha definido más arriba, y la definición y realizaciones particulares indicadas en relación a dichas variantes de las secuencias sentido se aplican a las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO. 31-35 y a las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO. 41-45.

En una realización preferida, el ARNm diana es el que codifica la isoforma PIAS2α. Por tanto, todas las realizaciones anteriores se aplican también al ARNm PIAS2α, sustituyendo la mención a PIAS2β por PIAS2α y PIAS2α por PIAS2β. En una realización particular, la secuencia diana del ácido nucleico de la invención se encuentra en el exón 13 del ARNm PIAS2α.

2- Vector de la invención

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia antisentido del ácido nucleico según cualquiera de las realizaciones anteriores en relación al primer aspecto de la invención. Preferiblemente, el vector además comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia sentido del ácido nucleico de la invención, según cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención.

Según se usa en la presente invención, el término "vector", se refiere a un vehículo por el que un polinucleótido o una molécula de ADN puede ser manipulada o introducida en una célula. El vector puede ser un polinucleótido linear o circular o puede ser un polinucleótido de mayor tamaño o cualquier otro tipo de construcción tal y como el ADN o el ARN de un genoma viral, un virión o cualquier otra construcción biológica que permite la manipulación del ADN o su introducción en la célula. Se entiende que las expresiones "vector recombinante", "sistema recombinante" se pueden usar de forma intercambiable con el término vector. El experto en la materia apreciará que no existe limitación en cuanto al tipo de vector que puede ser utilizado ya que dicho vector puede ser un vector de clonaje adecuado para la propagación y para obtener los polinucleótidos o construcciones génicas adecuadas o vectores de expresión en distintos organismos heterólogos adecuados para la purificación de los conjugados. Así, vectores adecuados de acuerdo a la presente invención incluyen vectores de expresión en procariotas tales como pUC 18, pUC 19, Bluescript y sus derivados, mp l 8, mp l 9, pBR322, pMB9, CoIEl , pCRl , RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1 , pEFl/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-

HCMV, pUB6/V5-His, pVAXl, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1 , pML2d y pTDTl.

El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Joseph Sambrook, David W. Russel Eds. 2001, 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York).

En una realización preferida, el vector de la invención es un vector viral. En otra realización preferida, el vector de la invención comprende la doble expresión de la enzima Luciferasa y mCherry separadas por un elemento IRES (Internal Ribosomic Entry Site), de manera que asegura que por cada molécula de mCherry se transcribe un molécula de Luciferasa. De esta forma, es posible evaluar de forma rápida infección viral de la población por microscopia de fluorescencia convencional y a su vez asegurar la cuantificación posterior de la masa tumoral mediante luminescencia.

En una realización particular, todas las definiciones y realizaciones indicadas en relación al primer aspecto de la invención se aplican al segundo aspecto de la invención.

3- Célula huésped de la huésped de la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una célula huésped que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, o el vector según cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención.

Las células huésped o células hospedadores de la invención, son capaces de expresar o comprender los ácido nucleicos de la invención.

El término “célula huésped” o “célula hospedadora” se refiere en la presente invención a una célula que comprende un ácido nucleico o un vector de la invención, para lo cual dicha célula ha podido ser transformada, transfectada o infectada con una construcción o vector proporcionado por esta invención. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al., 2001, citado supra, Chenlo M.et al.,

EBioMedicine, 43:537-552, 2019; García M. et al., Sci. Rep. 7:42937, 2017; Garcia-Rendueles A.R. et al., Oncogene, 36(5):652-666, 2017; Bravo S.B. et al., J Clin Endocrinol Metab. 98(6):2431-2441, 2013; Diaz-Rodriguez E. et al., Oncogene, 31(23):2824-35, 2012; Bravo SB et al., Anal Biochem., 400(2):219-28, 2010).

En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula animal transfectada o infectada con un vector apropiado.

Células huésped adecuadas para la expresión de los conjugados de la invención incluyen, sin estar limitado, a células de mamíferos, plantas, insectos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, sin estar limitado, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género *Bacillus, Streptomyces* y *Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células del género *Escherichia* y *Pseudomonas*. Células de hongos incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Células de insectos incluyen, sin limitación, células de Drosophila y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para en la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.). células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células ECCs humana NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGVOl, SHEFl, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH y MCF-7 y células hMSCs. En una realización particular, la célula huésped de la invención se selecciona del grupo de células recogido en la base de datos *Cellosaurus ExpasY* (https://web.expasy.org/cellosaurus/, versión del 31 de julio 2019).

En una realización particular, todas las definiciones y realizaciones indicadas en relación al primer y segundo aspecto de la invención se aplican al tercer aspecto de la invención.

4- Composición farmacéutica de la invención

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico del primer aspecto de la invención, o el vector del segundo aspecto de la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

"Composición farmacéutica", como se usa aquí, se refiere a composiciones y entidades moleculares que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar como trastornos gástricos, mareos y similares, cuando se administra a un humano o animal. Preferiblemente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora de un gobierno estatal o federal o está incluido en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término "excipiente" se refiere a un vehículo, diluyente o adyuvante que se administra con el ingrediente activo. Tales excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua o soluciones acuosas salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, en particular para soluciones inyectables, se usan preferiblemente como vehículos. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin, 21a Edición, 2005; o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", Rowe C. R .; Paul J. S .; Marian E. P., sexta edición.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, agentes tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos , ésteres de ácidos grasos derivados de petróleo, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares

En una realización particular, todas las definiciones y realizaciones indicadas en relación al primer y segundo aspecto de la invención se aplican al cuarto aspecto de la invención.

5- Usos médicos de la invención

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un inhibidor de la proteína PIAS2β para su uso en el tratamiento del cáncer de un paciente.

El término "inhibidor", tal y como se usa en la presente invención, hace referencia a cualquier compuesto capaz de causar una disminución en la actividad de la proteína PIAS2β, en particular en la actividad de sumoilación, compuestos capaces de reducir la expresión del gen PIAS2β y compuestos capaces de reducir los niveles de la proteína PIAS2β. Compuestos capaces de reducir la expresión del gen PIAS2β incluyen compuestos que tienen la capacidad de reducir la expresión del gen PIAS2β reduciendo la transcripción del mismo, compuestos que tienen la capacidad de reducir o inhibir la expresión del ARNm PIAS2 β, y compuestos con capacidad para inhibir la proteína PIAS2 β.

En una realización particular, el inhibidor de la proteína PIAS2β es un compuesto capaz de inhibir la expresión del ARNm PIAS2β. La definición y realizaciones particulares indicadas en el primer aspecto de la invención en la definición de "inhibición de la expresión del ARNm de PIAS2β" y en relación a la inhibición de la expresión del ARNm de PIAS2β por el ácido nucleico de la invención, se aplican al inhibidor tal y como se usa en el presente aspecto de la invención, sustituyendo el término "ácido nucleico" por "inhibidor". En este sentido, el valor de referencia en relación al presente aspecto de la invención es aquel medido en ausencia del inhibidor de la invención.

En una realización particular, el inhibidor de la invención inhibe de manera específica la expresión del ARNm PIAS2β. La definición y realizaciones particulares indicadas en el primer aspecto de la invención en la definición de "inhibe de manera específica la expresión del ARNm PIAS2 β" se aplican al presente aspecto de la invención, donde el ácido nucleico de la invención se sustituye por el inhibidor de la invención.

Los procedimientos adecuados para determinar si un inhibidor de PIAS2β es capaz de disminuir la expresión del ARNm PIAS2β se han indicado en el primer aspecto de la invención.

Los inhibidores que inhiben la proteína PIAS2β son aquellos capaces de reducir específicamente la cantidad de proteína PIAS2β en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 90 %, o en un 100%, y todos los intervalos entre un 5 % y un 100 % respecto de un valor de referencia. En otra realización particular, la inhibición de la proteína PIAS2β consiste en reducir la actividad de la proteína PIAS2β en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 90 %, o en un 100%, y todos los intervalos entre un 5 % y un 100 % respecto de un valor de referencia.

En una realización particular, el valor de referencia es aquel medido en ausencia del inhibidor de la invención.

En una realización preferida, la inhibición de la proteína PIAS2β de las realizaciones anteriores, se refiere a la inhibición de la proteína PIAS2β de una célula, grupo de células, extracto celular, tejido, extracto de células de un tejido, preferiblemente en el que las células o el tejido son de la glándula tiroides, más preferiblemente del tejido folicular de la glándula tiroides, aún más preferiblemente de un tumor del tejido folicular de la glándula tiroides, incluso más preferiblemente de un carcinoma del tejido folicular de la glándula tiroides, incluso aún más preferiblemente, de un carcinoma seleccionado del grupo que consiste en un carcinoma anaplásico, carcinoma pobremente diferenciado y un carcinoma recurrente de la glándula tiroides. En una realización aún más preferida, la inhibición de la proteína PIAS2β de las realizaciones anteriores, se refiere a la inhibición de la proteína PIAS2β de una célula, grupo de células, extracto celular, tejido, extracto de células de un tejido, preferiblemente en el que las células o el tejido son de un carcinoma anaplásico o pobremente diferenciado de la glándula tiroides, preferiblemente de un carcinoma anaplásico de la glándula tiroides.

En una realización particular, la inhibición de la proteína PIAS2β de las realizaciones anteriores, se refiere a la inhibición de la proteína PIAS2B extraída de la célula, grupo de células, extracto celular, tejido, extracto de celular del tejido indicados en cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización particular, el inhibidor de la invención inhibe de manera específica la proteína PIAS2β. La expresión "inhibe de manera específica la proteína PIAS2β", o "inhibición específica de la proteína PIAS2β", se refiere a la inhibición de la proteína PIAS2β, tal y como se ha definido arriba y según cualquiera de las realizaciones particulares y preferidas indicadas arriba, en la que además, se inhibe la proteína PIAS2β sin inhibir una proteína diferente a PIAS2B, como puede ser una isoforma PIAS2 diferente de PIAS2B, como puede ser PIAS2α.

Los procedimientos adecuados para determinar si un inhibidor actúa disminuyendo los niveles o la función de la proteína PIAS2β incluyen la cuantificación por medio de procedimientos convencionales, por ejemplo, usando anticuerpos con una capacidad para unirse específicamente a las proteínas codificadas por el gen de PIAS2β (o a fragmentos del mismo que contienen determinantes antigénicos) y la posterior cuantificación de los

complejos anticuerpo-antígeno resultantes. Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos que se pueden usar en la presente invención, que usan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios); entre estas técnicas se incluyen bandas western o transferencia western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitiva (inmunoensayo enzimático), DAS-ELISA (ELISA de tipo sándwich de doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas y de inmunohistoquímica, técnicas basadas en el uso de biochips o micromatrices de proteína incluyendo anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otras formas de detectar y cuantificar los niveles de la proteína de interés incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

En otro modo de realización, el inhibidor de PIAS2β específico actúa inhibiendo la actividad de PIAS2β. Un inhibidor de PIAS2β específico para su uso en la presente invención puede inhibir específicamente la actividad de PIAS2β en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, o al menos un 90 %, y todos los intervalos entre un 5 % y un 100 %. Puesto que PIAS2β es una Sumo E3 ligasa, los procedimientos adecuados para determinar si un inhibidor actúa haciendo disminuir la actividad PIAS2β incluyen cualquier procedimiento que permita la determinación de sumoilación tal como mediante la determinación de SUMOilación de MDA5, empleando ensayos ampliamente conocidos tal y como los descritos en El Motiam A. et al, FASEB Journal, 2019, 33, 643-649.

En una realización particular, el inhibidor de PIAS2β es citotóxico en células tumorales, preferiblemente en células de cáncer de tiroides, más preferiblemente en células seleccionadas del grupo que consiste en células de cáncer anaplásico, de cáncer pobremente diferenciado, de cáncer recurrente de tiroides y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el inhibidor de PIAS2β es citotóxico en células de cáncer anaplásico de tiroides y en células de cáncer pobremente diferenciado de tiroides, preferiblemente en células de cáncer anaplásico de tiroides.

El término "citotóxico" o "efecto citotóxico", se refiere en la presente invención a la capacidad de un compuesto, preferiblemente el inhibidor de la invención, de ser tóxico para determinadas células, i.e. de inducir la muerte de dichas células, preferiblemente de células tumorales.

La expresión “células tumorales”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a células que provienen de un determinado tumor o cáncer, ya sea las que están presentes en un tumor en crecimiento en el cuerpo de un paciente, o células en crecimiento en un cultivo celular y que provienen del tumor de un paciente. En una realización preferida, las células tumorales provienen de un cáncer de tiroides, seleccionado del grupo que consiste en cáncer anaplásico, cáncer pobremente diferenciado y cáncer recurrente de tiroides. Más preferiblemente, provienen de cáncer anaplásico o de cáncer pobremente diferenciado de tiroides, aún más preferiblemente, de cáncer de tiroides anaplásico.

En un modo de realización particular, el inhibidor de PIAS2β se selecciona del grupo que consiste en los ácido nucleicos del primer aspecto de la invención, un anticuerpo que reconoce de manera específica a PIAS2β o un aptámero que reconoce de manera específica a PIAS2β.

La expresión “capaz de reconocer de manera específica PIAS2β” se refiere en la presente invención a la capacidad de una molécula de reconocer PIAS2β pero no otra proteína, como puede ser otra isoforma de PIAS2, como puede ser PIAS2α.

El término “tratamiento”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier tipo de terapia, que tenga como objetivo la terminación, mejora o reducción de la susceptibilidad a padecer una condición clínica, como se describe aquí. Así, “tratamiento”, “tratar”, y sus términos equivalentes se refieren a la obtención de un efecto deseado farmacológica o fisiológicamente, que cubre cualquier tratamiento de una afección patológica o trastorno en un mamífero, incluyendo el ser humano. El efecto puede ser profiláctico en términos de proporcionar prevención total o parcial de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al mismo. Es decir, "tratamiento" incluye (1) inhibir la enfermedad, por ejemplo deteniendo su desarrollo, (2) interrumpir o finalizar el desorden o por lo menos los síntomas asociados al mismo, por lo que el paciente ya no sufriría la enfermedad o sus síntomas, por ejemplo provocar la regresión de la enfermedad o sus síntomas mediante la restauración o reparación de una función perdida, ausente o defectuosa, o estimular un proceso ineficiente, o (3), aminorar, aliviar o mejorar la enfermedad, o los síntomas asociados a la misma, donde aminorar se utiliza en un sentido amplio para referirse a, al menos, una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor, o deficiencia inmune.

El término “paciente”, “sujeto”, “individuo” referido en la presente invención se aplica a un paciente con cáncer, en el que el paciente es un miembro de una especie de un

animal mamífero, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

Para el uso en la prevención y/o tratamiento acorde a la invención, el inhibidor está presente en una cantidad eficaz.

El término cantidad "eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente farmacológicamente activo se entiende como una cantidad no tóxica pero suficiente del fármaco o agente para proporcionar el efecto deseado. En la terapia de combinación de la presente invención, una "cantidad eficaz" de un componente de la combinación es la cantidad de ese compuesto que es efectiva para proporcionar el efecto deseado cuando se utiliza en combinación con los otros componentes de la combinación.

A pesar de que las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos para las cantidades eficaces del agente de la invención pertenece a la experiencia común de aquellos expertos en la técnica. En general, la dosis necesaria para proporcionar una cantidad eficaz de dicho compuesto, que puede ser ajustado por un experto en la técnica variará dependiendo de la edad, salud, condición física, sexo, dieta, peso, frecuencia del tratamiento y la naturaleza y grado de deterioro o enfermedad, condición médica del paciente, la vía de administración, consideraciones farmacológicas tales como la actividad, eficacia, perfil farmacocinético y de toxicología del compuesto particular utilizado, si se utiliza un suministro de fármaco del sistema, y si el compuesto se administra como parte de una combinación de fármacos.

El término “cáncer” o “tumor” utilizado aquí, se refiere a una enfermedad caracterizada por una división celular incontrolada (o por un incremento de supervivencia o resistencia a la apoptosis) y por la habilidad de dichas células de invadir otros tejidos vecinos (invasión) y extenderse a otras áreas del cuerpo donde las células no se encuentran normalmente localizadas (metástasis) a través de los vasos linfáticos y sanguíneos, circulando a través del torrente sanguíneo, y después invadir tejidos normales en otras partes del cuerpo. Dependiendo de si se pueden o no extender por invasión y metástasis, los tumores se clasifican como benignos o malignos: tumores benignos son aquellos que no pueden extenderse por invasión o metástasis, por ejemplo, solo pueden crecer localmente; mientras que los tumores malignos son aquellos capaces de extenderse por invasión y metástasis.

En una realización particular, el cáncer se selecciona del grupo que consiste un carcinoma de anaplásico o indiferenciado de tiroides, un carcinoma pobremente diferenciado

de tiroides, carcinoma recurrente de tiroides, carcinoma diferenciado de tiroides que incluye el carcinoma papilar y el carcinoma folicular de tiroides. En una realización preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma anaplásico de tiroides, carcinoma pobremente diferenciado de tiroides y carcinoma indiferenciado recurrente de tiroides. En una realización aún más preferida, el cáncer es carcinoma anaplásico de tiroides.

El "carcinoma anaplásico (CA) de tiroides" referido en la presente invención es un tumor maligno de la glándula tiroides compuesto por células foliculares tiroideas altamente indiferenciadas. El CA, también denominado carcinoma tiroideo indiferenciado, es el tumor maligno primario tiroideo más agresivo, con una supervivencia media de solo el 10-20% en el primer año. Aunque está aumentando el número de pacientes con más de un año de vida, a pesar de las terapias agresivas, la supervivencia media del CA no ha mejorado significativamente en los últimos 20 años. Los pacientes suelen ser de edad madura entre 60-70 años y el tumor suele presentarse clínicamente como una masa en el cuello que crece rápidamente e infiltra las estructuras del cuello causando dolor, ronquera, disnea y/o disfagia. Aproximadamente el 35% de los pacientes tienen metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

Macroscópicamente los tumores son grandes e infiltrantes, carnosos y con zonas de hemorragia y necrosis. Histológicamente la morfología es variable, aunque puede agruparse en 3 patrones morfológicos principales (solos o en combinación): patrón sarcomatoide, patrón de células gigantes y patrón epitelial. El CA sarcomatoide está formado por células fusiformes con características similares a las que se ven en el sarcoma pleomorfo de alto grado. El CA de células gigantes contiene células malignas pleomórficas que en ocasiones son multinucleadas. El CA epitelial se presenta con nidos cohesivos de células escamosas o escamoides y ocasionales focos de queratinización. En todos los casos es frecuente la necrosis, elevada actividad mitótica, un crecimiento muy infiltrativo e invasión vascular. Es también común la presencia de infiltrado inflamatorio agudo, macrófagos infiltrando el tumor, presencia de elementos heterólogos (por ejemplo, cartílago oy/o hueso neoplásico) y/o células gigantes multinucleadas de tipo osteoclástico. A diferencia del CA, el carcinoma tiroideo escamoso muestra diferenciación escamosa en la totalidad de sus células. Existen también raras variantes de CA de tipo paucicelular, angiomatoide, rabdoide, linfoepitelioma y de célula pequeña. En el estudio inmunohistoquímico, a diferencia de lo que ocurre en los carcinomas diferenciados (papilar y folicular) y en el carcinoma pobremente diferenciado

las células tumorales son negativas para tiroglobulina y TTF1, mientras que PAX8 y FoxA1 suele ser positivo en el 50% de los casos de CA. Aunque la mayoría de los casos de CA son irresecables en el momento de la presentación, algunos pacientes pueden beneficiarse de cirugía agresiva con radioterapia y/o quimioterapia adyuvante. Debido a que los CA encontrados incidentalmente en piezas de tiroidectomía por carcinoma diferenciado pueden tener mejor curso clínico, debe indicarse siempre en el informe anatomopatológico el porcentaje de CA. Hay también numerosos ensayos en marcha con nuevas terapias dirigidas y/o inmunoterapia contra el CA.

El "carcinoma pobremente diferenciado (CPD) de tiroides" referido en la presente invención es una neoplasia de células foliculares que muestra limitada evidencia de diferenciación folicular y que tanto morfológicamente como desde el punto de vista del comportamiento biológico es intermedio entre los carcinomas diferenciados (papilar y folicular) y el carcinoma anaplásico. Los criterios histopatológicos diagnósticos del CPD son los del llamado consenso de Turín. Este consenso incluye un algoritmo diagnóstico basado en los siguientes criterios para el diagnóstico de CPD: 1) presencia de patrón de crecimiento sólido/trabecular/insular, 2) ausencia de núcleos con características convencionales de carcinoma papilar de tiroides, y 3) presencia de al menos alguno de los siguientes datos: núcleos convolutos, 3 o más figuras de mitosis por 10 campos de 400 aumentos y necrosis tumoral. Estos criterios han sido validados en series más recientes. Se ha evidenciado que la presencia de un 10 % de áreas con criterios de CPD en un carcinoma bien diferenciado ya se asocia a peor pronóstico. Además, los criterios de CPD también son aplicables a los carcinomas de células de Hürthle y a la variante cribiforme-morular de carcinoma papilar. Las alteraciones moleculares asociadas al CPD incluyen eventos "driver" precoces típicamente asociados a carcinomas bien diferenciados (por ejemplo mutaciones en RAS o en BRAF) así como otras alteraciones que ocurren como eventos finales asociados a desdiferenciación (por ejemplo mutaciones en TP53, TERT, CTNNB1 y AKT1). La carga mutacional del CPD es intermedia entre el carcinoma papilar bien diferenciado y el carcinoma anaplásico. La supervivencia global del CPD a 5 años oscila entre el 60-70%. Las recurrencias suelen desarrollarse dentro de los 3 primeros años. El tiempo medio de supervivencia del CPD es de unos 5 años tras el diagnóstico. El CPD tiene generalmente una pobre respuesta al tratamiento con yodo radiactivo.

El “carcinoma de tiroides recurrente” referido en la presente invención es un tumor que proviene, o que resulta del recrecimiento de un cáncer de tiroides que ya ha sido tratado o extraído, más concretamente de células de un cáncer o tumor de tiroides que ya ha sido tratado o extraído. Generalmente proviene de un cáncer de tiroides diferenciado o pobremente diferenciado. El carcinoma recurrente de tiroides puede haber recrecido en la misma zona del cuerpo en la que se encontraba el tumor de tiroides del que proviene, o bien crecer en una zona del cuerpo, tejido u órgano diferente que el cáncer de tiroides en la glándula del que proviene. En este sentido, el cáncer de tiroides recurrente se puede clasificar como local o metastásico. El cáncer de tiroides recurrente puede provenir de un cáncer diferenciado o pobremente diferenciado y tratarse también de un cáncer diferenciado o pobremente diferenciado. Se suele detectar por la presencia en sangre de proteínas específicas de la glándula tiroides, generalmente la proteína tiroglobulina. Concretamente, a los pacientes que presentan este tipo de tumores se les ha extraído anteriormente la glándula tiroides, como tratamiento frente al cáncer de tiroides original. En este sentido, dado que en principio carecen células de la glándula tiroides, no deberían ser capaces de sintetizar ni de presentar en sangre proteínas específicas de la glándula tiroides en sangre. Por tanto, la presencia en sangre de proteínas específicas de la glándula tiroides en sangre es un indicativo de que células del cáncer de tiroides original han proliferado de modo que el cáncer de tiroides original ha recrecido.

El “carcinoma papilar (CP) de tiroides” referido en la presente invención es un tumor epitelial maligno con evidencia de diferenciación folicular y una serie de características nucleares. El CP es generalmente invasivo. Su diagnóstico requiere la existencia de papilas, invasión o rasgos citológicos de CP. Es el tipo predominante de cáncer tiroideo y el cáncer tiroideo que más se está incrementando en todo el mundo. La incidencia del CP en las mujeres triplica a la de los hombres. Aproximadamente el 20% de los casos de CP son multifocales. A diferencia del carcinoma folicular, el CP tiene tendencia a diseminarse por vía linfática dando metástasis a ganglios linfáticos regionales. Son frecuentes las metástasis a los ganglios linfáticos laterales del cuello y a los de la línea media (compartimento central y niveles VI y VII). La diseminación vía hematógena es más rara y suele afectar a los pulmones. Como grupo, el CP tiende a ser biológicamente indolente, con un excelente pronóstico, unas tasas de supervivencia del 95% a los 5 años y una tasa de más del 90% a 20 años.

El “carcinoma folicular (CF) de tiroides” referido en la presente invención es un tumor maligno de células foliculares en el cual no hay características nucleares de carcinoma papilar de tiroides. El CF es generalmente un tumor encapsulado y muestra un crecimiento invasivo. Los tumores de células foliculares con cambio oncocítico se denominan tumores de células de Hürthle y se clasifican de forma separada del CF. El CF incluye tres subtipos histológicos que se asocian a progresiva agresividad clínica: a) el CF mínimamente invasivo, caracterizado por la presencia exclusiva de invasión capsular, b) el CF encapsulado angioinvasivo, y c) el CF ampliamente invasivo. Los CFs con solo invasión capsular tienen un pronóstico excelente, pero cuanto mayor es el número de vasos invadidos por el tumor el pronóstico es peor. Los sitios de metastatización más comunes son hueso, pulmones, cerebro e hígado, aunque no son raras las metástasis a la dermis cutánea. La mutación del promotor de TERT ha resultado ser un marcador independiente de mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad y de mortalidad asociada al cáncer tiroideo diferenciado (papilar y folicular). Dado que los CFs son tumores bien diferenciados, suele haber respuesta al tratamiento con yodo radiactivo y largas supervivencias.

En otra realización particular de la invención, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un carcinoma indiferenciado o anaplásico de pecho, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, hígado, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, recto, páncreas, piel, hueso, medula ósea, sangre, timo, útero, testículo, hígado o hepatobiliar, carcinoma pobremente diferenciado de pecho, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, hígado, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, recto, páncreas, piel, hueso, medula ósea, sangre, timo, útero, testículo, hígado o hepatobiliar, carcinoma sarcomatoide de tiroides, pecho, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, hígado, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, recto, páncreas, piel, hueso, medula ósea, sangre, timo, útero, testículo, hígado o hepatobiliar, carcinoma pleomórfico de tiroides, pecho, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, hígado, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, recto, páncreas, piel, hueso, medula ósea, sangre, timo, útero, testículo, hígado o hepatobiliar, carcinoma de células fusiformes o de células gigantes de pecho, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, hígado, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, recto, páncreas, piel, hueso, medula ósea, sangre, timo, útero, testículo y de hígado o hepatobiliar.

En una realización particular, el cáncer es un carcinoma anaplásico.

La expresión “carcinoma anaplásico”, según se usa aquí, indica un neoplasma maligno que resulta de la proliferación no controlada de células transformadas de origen epitelial o que muestran ciertas características epiteliales pero que no muestran características citológicas asociadas con tipos tumorales más diferenciados, tales como la formación de glándulas o la presencia de uniones celulares características de los adenocarcinomas y de los carcinomas de células escamosas.

En una realización particular, el cáncer o el carcinoma anaplásico es un astrocitoma anaplásico, un linfoma anaplásico de células grandes o un meningioma anaplásico.

En una realización particular, el cáncer es adenocarcinoma ductal pancreático anaplásico o no diferenciado.

En una realización particular, el cáncer es carcinoma de pulmón anaplásico de células grandes o carcinoma de pulmón anaplásico de células gigantes.

En una realización particular, el cáncer es carcinoma gástrico no diferenciado.

En una realización particular, el cáncer es un cáncer caracterizado por presentar un elevado grado de aneuploidía.

El término "aneuploidía" en el presente documento se refiere a un desequilibrio de material genético causado por una pérdida o ganancia de un cromosoma completo, o parte de un cromosoma. Se entiende que un cáncer presenta un elevado grado de aneuploidía cuando el valor porcentual de células aneuploides medido por FISH es al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 6%, al menos 7%, al menos 8%, al menos 9%, al menos 10% de las células totales en el tumor.

En una realización particular, el cáncer es un cáncer primario o metastático,

En una realización particular, el inhibidor para su uso de la invención es un ácido nucleico de la invención según cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, un vector según cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención, o combinaciones de los mismos. En otra realización preferida, el inhibidor para su uso de la invención es un ácido nucleico según cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, o combinaciones de los mismos. En una realización particular, el inhibidor para su uso de la invención, es el ácido nucleico de la invención en el que la secuencia de nucleótidos antisentido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 y secuencias funcionalmente equivalentes, y la secuencia de nucleótidos

sentido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO.11, SEQ ID NO. 12 y secuencias funcionalmente equivalentes.

En una realización preferida, el inhibidor para su uso de la invención es el ácido nucleico de la invención en el que la secuencia de nucleótidos antisentido es SEQ ID NO. 6 o una secuencia funcionalmente equivalente y la secuencia de nucleótidos sentido es SEQ ID NO. 11 o una secuencia funcionalmente equivalente.

En una realización particular, el inhibidor para su uso de la invención es el ácido nucleico de la invención, en la que la secuencia de nucleótidos antisentido comprende una secuencia de al menos dos uracilos en el extremo 3'.

En una realización particular, el inhibidor para su uso de la invención es el ácido nucleico de la invención, en el que la secuencia de nucleótidos sentido comprende una secuencia de al menos dos uracilos en el extremo 3'.

En otra realización particular, el inhibidor para su uso de la invención es el ácido nucleico de la invención, en el que las secuencias antisentido y sentido comprenden una secuencia de al menos dos uracilos en sus extremos 3'.

En una realización particular, el inhibidor de la invención es el ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia antisentido SEQ ID NO. 26 o secuencias funcionalmente equivalentes y la secuencia sentido SEQ ID NO.31, o secuencias funcionalmente equivalentes.

En una realización particular, el inhibidor de la invención comprende una combinación de ácido nucleicos de la invención, preferiblemente la combinación de cualquiera de los ácidos nucleicos mencionados en las realizaciones anteriores en este quinto aspecto de la invención.

En una realización preferida, la invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer de un paciente, seleccionado del grupo que consiste en carcinoma anaplásico de tiroides, carcinoma pobremente diferenciado de tiroides, o carcinoma indiferenciado recurrente de tiroides, preferiblemente del grupo que consiste en el carcinoma anaplásico de tiroides y el carcinoma pobremente diferenciado de tiroides, más preferiblemente el carcinoma anaplásico de tiroides.

En una realización particular, el cáncer es cualquiera de los canceres indicados anteriormente en relación al uso médico del inhibidor de la invención en este quinto aspecto de la invención.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende el inhibidor para su uso de la invención, tal y como se ha definido en cualquiera de las realizaciones de este quinto aspecto de la invención.

En una realización particular, el inhibidor o la composición farmacéutica de la invención, se administran al menos una vez, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 veces por semana al paciente.

En otra realización particular, el inhibidor o la composición farmacéutica se administran por la vía más adecuada según su composición, por ejemplo, por vía sistémica (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), oral, parenteral o tópica, para lo cual se incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación del método deseado de administración. Además, también es posible administrar el inhibidor o la composición farmacéutica, por vía intranasal o sublingual, lo que permite la administración sistémica mediante un modo no agresivo de la administración. Además, la administración intraventricular puede ser adecuada. Una vía preferida de administración es la intravenosa.

En una realización particular, todas las definiciones realizaciones indicadas en relación a los aspectos primero, segundo, tercero y cuarto se aplican al quinto aspecto de la invención.

En una realización particular, el inhibidor para su uso de la invención inhibe la expresión de manera específica de la proteína PIAS2α, de manera que en las realizaciones descritas en este quinto aspecto de la invención, el término PIAS2β se substituye por PIAS2α, y el término PIAS2α por PIAS2β.

6- *Método y kit para la detección diferencial de la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β o de la isoforma α del gen PIAS2 en una muestra y método para la detección diferencial de un carcinoma de tiroides diferenciado de un carcinoma avanzado, de un carcinoma pobremente diferenciado o de un carcinoma anaplásico.*

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar de forma diferencial la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β o de la isoforma α del gen PIAS2 en una muestra, dicho proceso comprende:

(a) proporcionar al ensayo de PCR que contiene dicha muestra un oligonucleótido marcado que contenga una secuencia complementaria a una región del ácido nucleico diana, en donde dicho oligonucleótido marcado se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana uniéndose por los cebadores del paso (b) y en donde dicho oligonucleótido marcado tiene la secuencia SEQ ID NO:87 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o SEQ ID NO:88 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2;

(b) proporcionar una pareja de cebadores, en donde el primer cebador contenga una secuencia complementaria a una región de una cadena de la secuencia de ácido nucleico diana e inicie la síntesis de un producto de extensión y un segundo cebador que contenga una secuencia complementaria a la otra cadena de la secuencia de ácido nucleico diana o complementaria a una región en el producto de extensión del primer cebador e inicie la síntesis de una cadena complementaría de DNA; y en donde cada cebador se selecciona para que se hibride con su molde complementario corriente arriba de cualquier oligonucleótido marcado hibridado con la misma cadena de ácido nucleico en donde la pareja de cebadores está formada por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:90 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:91 y SEQ ID NO:92 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2,

(c) amplificar la secuencia de ácido nucleico diana empleando una polimerasa de ácido nucleico con actividad nucleasa 5' a 3' como agente polimerizante dependiente de molde bajo condiciones permisivas para los pasos de ciclación de la PCR de (i) hibridación de los cebadores y el oligonucleótido marcado con una secuencia de ácido nucleico molde contenida dentro de la secuencia diana, y (ii) extensión del cebador en donde dicha polimerasa de ácido nucleico sintetiza un producto de extensión de cebador mientras la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa de ácido nucleico libera simultáneamente fragmentos marcados de las dobles cadenas hibridadas que comprenden oligonucleótidos marcados y sus complementarias secuencias molde de ácido nucleico, creando de este modo fragmentos marcados detectables y

(d) detectar y/o medir la señal generada por la hidrólisis del oligonucleótido marcado para determinar la presencia o ausencia de la secuencia diana en la muestra.

Las términos empleados para definir el método de la invención se han descrito con detalle, entre otros, en la patente europea EP919565-B1 a nombre de F.Hoffmann-La Roche que se incorporar en su totalidad a la presente descripción por referencia. Asimismo, formas preferidas de realización del método también se describen en detalle en la patente EP919565-B1. En una forma preferida de realización, el oligonucleótido marcado comprende un par de marcadores generadores de señal interactivos posicionados adecuadamente en el oligonucleótido para apantallar la generación de señal detectable, dichos marcadores están separados por un lugar dentro del oligonucleótido susceptible a escisión por nucleasa, de este modo permite, durante la extensión de cebadores, la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa de ácido nucleico para separar el primer marcador generador de señal interactivo del segundo marcador generador de señal interactivo por escisión en el lugar susceptible, produciendo así una señal detectable. En una forma de realización aún más preferida, dicho primer marcador es un sustrato quimioluminiscente y dicho segundo sustrato es un fluoróforo que interacciona con el mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para la detección diferencial la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β o de la isoforma α del gen PIAS2 en una muestra que comprende:

(a) al menos un oligonucleótido marcado que contiene una secuencia complementaria a una región del ácido nucleico diana en donde dicho oligonucleótido marcado tiene la secuencia SEQ ID NO:87 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o SEQ ID NO:88 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2 y en donde el extremo 3' del oligonucleótido marcado esté bloqueado para prevenir la extensión por una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad 5' a 3 y el oligonucleótido marcado contiene marcadores primeros y segundos estando el primer marcador separado del segundo por un sitio susceptible de escisión por una nucleasa y en el que los marcadores del oligonucleótido marcado constituyen un par de marcadores generadores de señales interactivas situados sobre el oligonucleótido para apantallar la generación de señal detectable y

(b) al menos una pareja de cebadores, formada por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:90 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:91 y SEQ ID NO:92 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2.

Los términos empleados para definir el kit de la invención se han descrito con detalle, entre otros, en la patente europea EP919565-B1 a nombre de F.Hoffmann-La Roche que se incorporar en su totalidad a la presente descripción por referencia. Asimismo, formas preferidas de realización del kit de la invención también se describen en detalle en la patente EP919565-B1. En una forma preferida de realización, el kit comprende adicionalmente una polimerasa de ácido nucleico con actividad nucleasa 5' a 3'. En otra forma de realización aún más preferida de realización, dicha polimerasa de ácido nucleico es una enzima termoestable, preferiblemente una DNA Polimerasa de especies de *Thermus*.

La invención se describe a continuación por medio de los siguientes ejemplos que tienen carácter meramente ilustrativo y no limitativo del ámbito de la invención.

***

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Cultivos celulares

A- Cultivos primario de células foliculares:

El cultivo se realiza con un medio específico h7H diseñado para los cultivos de tiroides como se ha descrito previamente (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441; Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5): 652-666). Este es un medio humanizado con siete componentes aditivos, Medio Coon's modificado (5% FCS, 5% NCS, Penicilina y Glutamina) con Hormonas, Transferrina, Iodo, Oligoelementos, Antioxidantes, Metabolitos y Etanol.

El sistema de cultivo de tejido primario está protocolizado de forma estricta, para evitar contaminaciones bacterianas, fundamentalmente mycoplasmas. Se utilizaron alícuotas de medio cultivo h7H estériles y selladas para introducir los fragmentos sobrantes seleccionados de la pieza quirúrgica los fragmentos dentro del tumor (T) o tejido normal (N) bajo campana horizontal. La dispersión del tejido y el establecimiento del cultivo (pase

1) se realizó como está descrito (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441; Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5): 652-666). También se usaron esos métodos descritos para el pase de cultivo de 1:2 platos con tripsina cuando se llenaban de células (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441; Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5): 652-666).

Los cultivos se caracterizan para la expresión de marcadores fenotípicos de que son mantenidos tras varios pases, por RT-PCR, qRT-PCR y en algún caso proteína por western e inmunofluorescencia. También se hace el genotipado mediante identificación por STRs para asegurarnos del macheado con el tejido de origen. Ambas tecnologías descritas en Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441; Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5): 652-666)

B- Cultivo de líneas celulares comerciales

La baja incidencia de los carcinomas anaplásicos hace que dispongamos de muy pocos cultivos primarios de esta patología lo que nos llevó a realizar los experimentos en líneas celulares comerciales. Las líneas fueron seleccionadas a partir de varias bases de datos, entre ellas (Cellosaurus, https://web.expasy.org/cellosaurus/) y están certificadas por el International Cell Line Authentication Committee (ICLAC) y confirmadas como células de originales de tiroides humano, no contaminadas con otras líneas ni figuran en el Register of Misidentified Cell Lines (v9) (https://iclac.org/databases/cross-contaminations/).

Se caracterizaron en nuestro laboratorio sus STRs para asegurar que el perfil genético coincidiese con el de las bases de datos, como las mutaciones conocidas más características (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441; Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5): 652-666)

Se compraron 6 líneas celulares comerciales: Carcinoma Anaplásico de Tiroides: MB-1, BHT-101, CAL-62 (DSMZ Germany); 8305C (ECACC, Sigma)-. Carcinoma Pobremente diferenciado: BCPAP: (DSMZ), FTC-238 (ECACC).

Él crecimiento de las líneas celulares se realizó en medio h7H, como describimos previamente (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441; Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5): 652-666). También está descrito previamente los métodos de rutina de pase de las células cada semana en dilución 1:10 tras la incubación con tripsina (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441; Garcia-Rendueles et al,

Oncogene, 2017, 36(5): 652-666).

Diseño y síntesis de los dsRNAi

Para el diseño se ha utilizado el programa bioinformático BlockiTTM siRNA Designer, Ambion, Life Technologies y las recomendaciones del manual Silencer® siRNA Construction Kit, Ambion (Silencer® siRNA construction kit manual, Life Technologies Corporation , Thermo Fisher Scientific). Dentro de las secuencias de la isoforma PIAS2 b potencialmente susceptibles como diana se han seguido las siguientes condiciones para seleccionar las definitivas: 1) Que la secuencia diana empezase por AA: por tanto, la secuencia siRNA acabase en UU, 3' UU *hanging end* (UU en el oligonucleótido para su transcripción). 2) Que tuviesen un contenido de G/C entre >25% a 50%

Para cada secuencia del dsRNAi se obtiene una secuencia de oligonucleotidos *sense* y *antisense* complementarias al dsRNAi. A cada una de las secuencias diana con 21 nucleótidos se añadieron 8 nucleótidos complementarios al primer que contiene el sitio consenso de unión de la RNA polimerasa bacteriana T7 a promotores (5´-CCTGTCTC-3'), y esto se hizo tanto en la cadena *antisense* como en la *sense*. Para el control negativo se usó la misma composición de nucleótidos que el dsRNAi experimental, pero sin homología significativa de la secuencia con el genoma humano. Y también se añadieron los 8 nucleótidos complementarios al consenso de la T7 en promotores. Para elegir las mejores secuencias y eliminar *off targets*, las secuencias han sido revisadas con el programa BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Las secuencias se alinearon contra el Ensembl. Todas las secuencias que cumplan los requisitos anteriores, pero no tengan resultados en Emsembl también fueron excluidas.

Se han obtenido 5 secuencias de dsRNAi (PIAS2b dsRNAi 1, PIAS2b dsRNAi 2, PIAS2b dsRNAi 3, PIAS2b dsRNAi 4 y PIAS2b dsRNAi 5) y un control ns-dsRNAi (Ver Tabla 4).

Para la síntesis de las secuencias de dsRNAi se usó un kit comercial de construcción de dsRNAi Silencer® siRNA Construction Kit (AM1620M) (Ambion, luego absorbida por Invitrogen, y ahora Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante. En reacciones separadas, los dos oligonucleótidos de cada secuencia son hibridadas con el primer del

Promotor T7 (incluido en el kit). Posteriormente se purifican e hibridan cada secuencia sense y antisense complmentarias siguiendo las instrucciones del kit. Una vez cuantificados se mantienen en alícuotas. Los dsRNAi fueron transfectados en las células con diversos protocolos (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441; Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5): 652-666).

Producción de Lentivirus con shRNAs inducibles y cálculo de la concentración de Doxiciclina. Transducción viral.

Los lentivirus se produjeron mediante transfección de TRIPZ Inducible Lentiviral Non-silencing shRNA Control o TRIPZ Human PIAS2 shRNA (Thermo) , junto con pHelper virus, y psPAX2 (Addgene). Las células empaquetadoras HEK293T se transfectaron con CaCl2 con protocolos habituales. Por cada placa de 90mm, se transfectaron 20µg TRIPZ vector, 15µg de pHelper virus, 6µg de psPAX2 (lentivirus). Durante dos días se recogió el medio que después se filtró, y se cocentraron las partículas virales mediante ultracentrofugación en rotor basculante SW32Ti (369694, Beckman Coulter). a 19.500rpm durante 2 horas a 4ºC en una ultracentrífuga Optima L-100XP (392052, Beckman Coulter). El pellet se resuspende en 60µL de medio Coom´s h7H y se incuba en hielo húmedo durante 10 minutos. El sobrenadante se reparte en alícuotas de 50µL que se guardan a -80ºC.

Los virus se titulan mediante qPCR para calcular la concentración (Barczak et al, Molecular Biotechnology. 2015 57(2):195-200). A partir de ahí se realiza una segunda titulación funcional mediante infección de HEK293T con diluciones seriadas para calcular la multiplicidad de infección (MOI).

Para determinar la concentración de Doxiciclina que mejor induce la expresión de los shRNAs se testaron en la línea celular CAL-62 las concentraciones 0 µg/mL (Control), 0,5 µg/mL, 1 µg/mL y 2 µg/mL. La mejor concentración fue la de 2 µg /mL. Se cuentan las colonias de células TurboRFP o mCherry positivas en cada pocillo correspondiente a cada factor de dilución. Cada colonia está formada por un grupo pequeño de células y se ha de considerar como si fuera una célula transducida debido a las divisiones celulares producidas durante las 72 horas previas.

Después de obtenidos los lentivirus T-Scr-sh y T-PIAS2-sh se infectaron las líneas celular anaplásicas de tiroides. Al día siguiente de sembrar las células se ponen en 1 mL de medio sin suero y con 8,9µg/mL de polibreno. Una vez añadida la cantidad de partículas virales necesarias se incuban las multiplacas hasta el dia siguiente. Añadir medio de cultivo

completo e incubar durante 48horas. Las células positivas se seleccionaron con Puromicina, antibiótico de selección de las células infectadas, generando las líneas estables reguladas T-PIAS2-sh y T-Scr-sh.

Tras esto se seleccionaron en el sorter las poblaciones negativas (no rojas) de cada línea. Posteriormente, se pasaron por el sorter células de estas mismas poblaciones pero que habían sido inducidas con Doxiciclina durante la noche anterior a sortearlas. Se han seleccionado las poblaciones rojas (HI) y las muy rojas (SU). Las poblaciones seleccionadas se sembraron en ausencia de Doxiciclina para que volviesen a ponerse no rojas, negativas, y creciesen sin diferencias. Se han generado así cuatro poblaciones reguladas: T-PIAS2-sh_HI, T-PIAS2-sh_SU, T-Scr-sh_HI, T-Scr-sh_SU.

Estudios funcionales en células

A- Estudio de proliferación celular

Los ensayos de cuantificación del número de células y proliferación se realizaron mediante un método colorimétrico (MTT) como describimos en Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5): 652-666)

B- Estudio del Ciclo celular

Estudio de Mitosis : Videomicroscopía (*Time-Lapse*):

Para los experimentos de videomicroscopía o *Time-Lapse* se usan placas multipocillo de 96 y el microscopio Leica con cámara celular humidificada y CO2 (OKI) utilizando SiR-DNA (Spirochrome) como marcador nuclear como descrito en Lukinavičius et al, Nature Communication 2015;6:8497.

El microscopio dispone de una platina automática que permite por cada experimento usar varias condiciones de tratamiento y hacer varios replicados. Se suelen hacer un mínimo de 2 campos por replicado y un mínimo de 6 replicados por condición. Las fotos han sido analizadas con el programa LASX de Leica v 3.30, ayudada con supervisión manual para el contaje. Con el programa también se generaron los vídeos.

Estudio de ADN

Perfil STRs

Para realizar el perfil genético de los cultivos primarios y sus tejidos se usa el kit AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit pcr.como descrito en (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441)

Estudio de ARN

PCR cuantitativa

Una vez extraído el ARN y una vez retrotranscrito a cDNA siguiendo métodos convencionales, se realizó la PCR cuantitativa bien por el método TaqMan (más específico pero menos sensible) bien por el método de SybrGreen (más sensible, menos específico), siguiendo protocolos convencionales (descritos en Chenlo et al. EBioMedicine. 2019 43:537-552; Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441) y utilizando los siguientes cebadores (Tabla 1).

Tabla 1: Cebadores utilizados para medir la expresión de ARNm

	Gene	Sequence	Amplification size	Annealing T°
TAQMAN	TBP	Fw: 5′- GCCCGAAACGCCGAATAT -3′	67bp	60°C
		Rv: 5′- TTCGTGGCTCTCTTATCCTCATG -3′		
		Pb: 5′- TCCCAAGCGGTTTGCTGCGGTA -3′		
	PIASa	Fw: 5′- TTGGCTCAAACCACTGTGTC -3′	171bp	60°C
		Rv: 5′- GGGTCTCGCTATGTTGCCTA -3′		
		Pb: 5′- CAAGCTGGGTGCGGTGGCTT -3′		
	PIASb	Fw: 5′- ATTTGAGGCTTGCCTTCTCA -3′	155bp	60°C
		Rv: 5′- TACCACCTCCCAAAATCTGC -3′		
		Pb: 5′- TGGGGTACGGTGTGACTGGAATG -3′		
SYBR GREEN	PIASa	Fw: 5′- CGGTTGATCCTGCTGCTATT -3′	144bp	60°C
		Rv: 5′- AAGATGTTCCAAGCTTCAGTTCA -3′		
	PIASb	Fw: 5′- CGGTTGATCCTGCTGCTATT -3′	182bp	60°C
		Rv: 5′- GCTTGCTGTTAAGGGTGAGG -3′		
	Global PIAS2	Fw: 5′- GCGGATTTCGAAGAGTTGAG-3′	142bp	60°C
		Rv: 5′- AGCCGCTCTTCAATAAATGC -3′		
	TBP (similares a arriba)	Fw: 5′- GCCCGAAACGCCGAATAT -3′	67bp	60°C
		Rv: 5′- TTCGTGGCTCTCTTATCCTCATG -3′		

Cada placa multipocillo de 96 se utiliza para una sola reacción y en cada una se miden las muestras por duplicado junto con controles positivos y negativos de la técnica (todos los reactivos a excepción de MMLV) y blancos (todos los reactivos a excepción del cDNA). Como control de la expresión para los ensayos cuantitativos de mRNA se utiliza TBP, ya

que su expresión es estable tanto en tejido como en líneas celulares (Radonic-et al. Biochem Biophys Res Commun. 2004 313(4):856-62)

Para expresar los resultados de cada gen se utiliza el método de la diferencia de umbral de ciclos o ΔCt (ΔCt =Ct_{gene} - Ct_{TBP}).

Estudios de proteínas

A- Análisis de Proteómica global 2D

Los geles 2D separan las proteínas presentes en las muestras en base a su punto isoeléctrico isoeléctrico, IP (primera dimensión) y a su peso molecular, MW (segunda dimensión). Para realizar estos estudios, las proteínas solubles de las muestras de los tirocitos humanos se suspendieron en distintos tampones de lisis descritos en la literatura. El mejor tampón de lisis fue: 7M Urea (17-1319-01, GE Healthcare), 2M Thiourea (RPN630, GE Healthcare), 4% CHAPS (C3023, Sigma), 40mM DTT (D9779, Sigma). La metodología de la separación 2D, la cuantificación de spots y la identificación por espectrometría de masas está descrita en nuestra literatura previa Bravo et al, International Journal of Peptides, 2011, 2011:969818).

B- Western blot

Los métodos de detección de proteínas mediante western blot e inmunofluorescencia están descritos ampliamente en nuestra literatura previa (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441; Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5): 652-666; Chenlo et al. EBioMedicine. 2019 43:537-552).

Estudios *in vivo*

A- Generación de poblaciones celulares

Para los estudios *in vivo* se generó una población con transducción del retrovirus MI-Luciferase-IRES-mCherry en los cultivos primarios de anaplásico (T-UC1- MI-Luciferase-IRES-mCherry). La población expresa RFP (proteína roja fluorescente) como control de infección de las células y luciferasa que permite seguir posteriormente el crecimiento de los tumores en los ratones.

B- Modelo ortotópico de xenoimplante de células de carcinoma anaplasico de tiroides de pacientes en ratón NOD-SCID (oPDX)

Se han utilizado ratones inmunodeprimidos hembra NOD-SCID (NOD.CB-17-Prkdc scid/Rj, Janvier Labs) (Hidalgo et al, 2014; Byrne et al, 2017) (5 controles y 4 tratados) con 7 semanas de edad en el momento de la inoculación.

Las células se implantaron de forma ortotópica en el lóbulo derecho de la glándula tiroides mediante cirugía del cuello con una jeringuilla Hamilton con aguja roma de 3 cm de longitud (100µL/30mm/PST3 (1710N, Hamilton). Para la técnica quirúrgica de implantación decidimos estandarizar nuestra propia metodología. El grupo de Sewell et al, Journal Visualized Experiments 2013, 74: 50097, estandarizó una técnica para la implantación de xenografts de líneas celulares de tiroides humanas, que incluía la sección de los músculos laríngeos para el acceso a la tiroides. Nuestro grupo decidió que esta técnica era demasiado agresiva para obtener un modelo relevante de carcinoma de tiroides humano ya que disrrumpía las estructuras musculares que rodean a la tiroides, generaba inflamación y podía alterar la fisiología endocrina del animal receptor.

El protocolo paso a paso es de la siguiente forma:

- Dos días antes de su implantación en el ratón se tripsinizan las células de la población con tripsina 1X, se cuentan en una cámara de Neubauer y se resiembran con una dilución 1:2. Esto se hace para mantener su estado activo y para hacer una estima del número de células disponibles.
- El día de la implantación, se resuspende el pellet celular en el volumen residual tras centrifugación con pequeños golpecitos y se añade un volumen aproximado de Matrigel (E1270, Sigma), se mantiene la mezcla en hielo (4ºC)
- Los ratones se anestesian con un volumen de Ketamina/Xilacina (100µL por cada 10g). Depilar el campo quirúrgico con crema depilatoria (Veet® crema depilatoria con aloe vera), limpiando la zona con una gasa y agua templada para retirar los restos de crema y desinfectar la zona con Betadine® antes de la cirugía. Se fijan las cuatro extremidades con esparadrapo. Se realiza una incisión vertical de aproximadamente 1 centímetro en la región media del cuello con un bisturí. Con la ayuda de una pinza, separar las glándulas submaxilares hasta visualizar la tráquea, con sus músculos y fascias. Se levanta el músculo esternotiroideo. Con la ayuda de una jeringuilla Hamilton, mantenida en frío para evitar la solidificación en el interior, inocular 25µL de la mezcla de células,

teniendo cuidado en no inyectarlas en la tráquea o traspasar con la aguja la glándula. Una vez inoculado, esperar unos segundos antes de retirar la aguja para favorecer la solidificación del Matrigel y así evitar la difusión de la mezcla a los tejidos contiguos. Cerrar la incisión con hilo de sutura de 4-0 (Mersil Soie, Ethicon) con dos-tres puntos independientes. Desinfectar y aplicar analgesia.

C- Ensayo de medición de bioluminiscencia in vivo

La medición se realiza mediante el protocolo habitual recomendado por el IVIS (Perkin Elmer) inyectando 300mg/kg de Luciferina (122799, Perkin Elmer) en el animal anestesiad o con isofluorano. La señal se recoge a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Se realiza la cuantificación de la señal, representado el valor máximo de señal en fotones/segundo con el programa Living Image 3.2 PerkinElmer (Inoue et al, . Int J Biomed Imaging. 2010; 2010:471408; Stewart et al, Nature. 2017 549(7670):96-100). Se realizó un seguimiento del crecimiento del tumor semanalmente durante 5 semanas antes de iniciar el tratamiento para comprobar el desarrollo del tumor en el animal.

D- Tratamientos dsRNAi in vivo

Tras la inyección de la suspensión celular los animales son distribuidos en grupos de 4 o 5 por caja. Y de esta forma se mantienen hasta la semana 7 donde comienza el tratamiento. En todos ellos se generaron tumores. A partir del tratamiento, los animales se mezclaron de forma randomizada a la hora del tratamiento y así se mantuvieron hasta el final del experimento.

Para que la vida media de los dsRNAi sea suficientese mezclaron con un vehículo, Atelocolageno (AteloGene koken, Cosmobio) que protege la degradación de los ácidos nucleicos por las nucleasas (Ochiya et al, Current Gene Therapy 2001 1: 31-52; Takei et al, Cancer Research 2004, 64: 3365-3370; Takeshita et al, Proceedings of the National Academy of Science of the USA 2005, 102 (34): 12177-12182; Takahashi et al, PLoS One 2013, 8(8):e73214).

Cuando los tumores alcanzaron grandes masas en el cuello (5 semanas) se tratan con una dosis de 200µL de 40µM por inyección/ratón intravenosa. Esta concentración se basó en trabajos previos publicados (Azuma et al, Biochemical Biophysics Research

Communication 2010, 391 (1): 1075-1079; Sasaki et al, Biochemical Biophysics Research Communication 2010, 399(1): 79-83).

Todos valores de las mediciones de bioluminescencia para cada animal son ajustados al tiempo inmediatamente antes del inicio del tratamiento (100%) y recalculados de forma correspondiente. Se representan curvas longitudinales conectando las medidas de ratones individuales y se calculó la regresión de los conjuntos de datos mediante regresión no lineal de tipo LOWESS. LOWESS (LOcally WEighted Scatter-plot Smoother) es un método de regresión ponderada localmente no paramétrico para generar una curva smooth entre dos grupos de datos (Jacoby WG, Electoral Studies. 2000;19(4):577-613). Se utilizó el software Graphpad Prism 8 con el algoritmo específico de (Chambers et al, Graphical methods for data analysis, wadsworth & Brooke/Cole publ. Comp., Pacific Grove, California. 1983).

E- Análisis histológico de los oPDX

Las piezas se fijan con formalina y se incluyen en parafina según procedimiento habitual (FFPE). Se tallan las piezas por el patólogo según procedimiento habitual hasta llegar a la zona media. A partir de ahí se seccionan hacia arriba y hacia abajo. Las secciones se tiñen con hematoxilin-eosina (H-E) o inmunohistoquímica. Se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos validados clínicamente para el diagnóstico del carcinoma anaplásico de tiroides: CK8+CK18, CK AE1AE3, PAX8, TTF1, Ki67, TG y p53.

Las secciones de H-E además de para observación microscópica general, se han utilizado para contar el número de células muertas del carcinoma (fondo rosa intenso y núcleo condensado negroide central) comparando el grupo control frente al tratado. Los contajes se han realizado con el programa FiJi (ImageJ 1.52) (https://fiji.sc/).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el programa Prism 8 (Graphpad Software Inc.). Todos los resultados son representados mediante la media ± SEM. Las muestras que demostraban fallos evidentes para la metodología usada han sido excluidas (exclusión técnica por alteración del protocolo; evento raro en esta tesis).

Los experimentos *in vitro* se realizan como mínimo 3 veces con entre 3-6

replicados por condición. En cada grupo de resultados, se realizaron primero un test de normalidad usando el test Kolgomorov-Smirnof para un n entre 5-7, el test Shapiro-Wilk para muestras con n igual o mayor a 3 y el test D'Agostino & Pearson para un n igual o mayor que 10.

Todas las comparaciones entre grupos de datos que siguen distribución normal se realizaron con el T test para comparar entre dos grupos, o con ANOVA para la comparación entre más de 2 grupos. En el caso de distribuciones no normales, se usaron el test de Mann-Whitney para comparar entre dos grupos y Kruskal-Wallis para la comparación entre más de 2 grupos respectivamente.

Los datos con $p < 0,05$ han sido considerados estadísticamente significativos (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Ejemplo 1.

Estudio de expresión diferencial mediante 2D-proteómica

Nuestro grupo estableció un sistema de cultivo *in vitro* de células foliculares de tiroides humano, h7H, donde se cuida cada etapa del método de cultivo para conseguir que 1) las células crezcan; 2) las células mantengan el fenotipo que poseen *in vivo* (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441). Uno de los elementos esenciales es el medio de cultivo que contiene siete grupos de elementos considerados esenciales y en los que se mantienen de forma muy estricta las concentraciones en rango con las encontradas en suero de hombres adultos sanos. Estos siete grupos incluyen: 1) iones y osmolaridad; 2) hormonas; 3) oligoelementos; 4) antioxidantes y vitaminas; 5) nutrientes y metabolitos; 6) yodo, 7) etanol.

Gracias a esta forma de cultivo somos capaces de crecer durante al menos veinte pases *in vitro* células normales de tiroides que hasta ese momento nadie era capaz de crecer, utilizándose los sobrantes quirúrgicos simplemente en cultivos agudos. Nuestros cultivos estaban enriquecidos en >95% en células de epitelio folicular (Bravo *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2013 98(6):2431-2441). Al ser capaces de crecer epitelio folicular normal y canceroso en las mismas condiciones, podíamos comparar y buscar mecanismos específicos diferenciales, sin distorsiones derivadas de la proliferación "per se", ya que en un tejido el epitelio canceroso se está dividiendo, pero el epitelio normal no. Esto se comprobó en nuestro estudio sobre el mecanismo de acción de TGF beta, uno de los factores más abundantes del epitelio normal y canceroso, que resetea su mecanismo de anti-proliferativo/pro-apoptótico en epitelio folicular normal a pro-proliferativo/anti-apoptótico en epitelio folicular de carcinoma diferenciado (Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5): 652-666.).

Nuestro siguiente objetivo era buscar nuevas proteínas que explicasen mecanismos de cáncer de tiroides y sirvieran como diagnóstico, pronóstico o tratamiento. Así, comenzamos un estudio de proteómica diferencial. Se extrajeron proteínas de dos cultivos normales T-NT1 y T-NT2; y para incidir en la diferencia "cáncer", decidimos incluir como "normal" un cultivo de bocio difuso por Enfermedad de Pendred, T-PS2. El bocio es un crecimiento de epitelio folicular "normal" causado por alguna causa; en este caso, la mutación de Pendrin (SLC26A4) conlleva alteración de la síntesis de hormonas tiroideas, y la hipófisis estimula con más TSH un crecimiento compensatorio del epitelio folicular.

Frente a ellos, se extrajeron proteínas de tres carcinomas papilares, dos T-PC2 y T-PC3. En la Tabla 2 se describen las características claves de la pieza de origen de cada cultivo.

Tabla 2: Características de los tejidos de origen de los cultivos utilizados en el estudio de 2D-proteómica

Normales	Características	Carcinoma Diferenciado	Características
T-NT2	Tiroides normal Mujer 24 años Carcinoma previo, folicular mínimamente invasivo Lóbulo contralateral	T-PC2	Carcinoma Papilar variante clásic Varón 34 años
T-NT3	Tiroides Normal Mujer 44 años Carcinoma Papilar variante folicular contralateral	T-PC3	Carcinoma Papilar variante células altas Varón 73 años
T-PS2	Nódulo Síndrome de Pendred, Mutación confirmada c.279delT, c.416-1G>A Varón 24 años		

Se extrajeron las proteínas en los primeros pases de crecimiento en cultivo, menos de pase 5, mediante extracción con Urea/Tiourea/Chaps. Se midieron las proteínas y se cargaron 50 microgramos en una tira de isoelectroenfoque de rango de pH: 4-7. Tras esta primera etapa, se corrió la tira en la segunda dimensión en un gel PAGE al 15%, y posteriormente se tiñó con tinción de plata. Las cuatro tiras de isoelectroenfoque y los cuatro geles se corrieron y se tiñeron juntos, para evitar variables por cualquiera de estas etapas. (Figura 1-A).

Los geles se escanearon y se analizaron con el programa PDQuest para un primer análisis (Figura 1-B), y se repitió el análisis con el programa SameSpots (Figura 1-C). Se seleccionaron los spots que fueran diferencialmente expresados entre los carcinomas frente a los cultivos normales de forma cuantitativamente relevante, y estadísticamente significativa en ambos análisis.

Como se puede observar en la figura 1-B los tres spots que cumplen esas características son el spot 2502, que aumenta 1,7 veces en cáncer, el spot 7003, exclusivo de cáncer, y el spot 8002 que se duplica en cáncer. Repetido el análisis, se confirmó el resultado (se muestra para el spot 8002, Figura 1-C).

Tras ello, se picaron los spots y se identificaron por espectrometría de masas (Figura 1-D). El spot 2502 es la vimentina, una proteína del citoesqueleto abundantemente expresada

en tejido tiroideo (Human Protein Atlas, www.proteinatlas.org). El spot 7003 nunca ha conseguido tener péptidos con score suficiente para ser identificado. Los spots 4304 y 5303 fueron identificados ambos como Beta-Actina. El spot 8002 se identificó como la proteína PIAS2, una proteína desconocida hasta el momento en relación con la tiroides.

El gen PIAS2 y sus isoformas

Realizamos un estudio *in silico* detallado de la proteína PIAS2 y su gen en humanos (Figura 2). Están descritos 16 tránscritos de mRNA en la base de datos Ensembl de los cuales sólo 8 tienen capacidad para ser traducidos y 8 no son codificantes. De los codificantes, 5 de esos tránscritos sólo codifican péptidos pequeños de entre 80-282 aminoácidos cuya relevancia funcional es desconocida en este momento. Los 3 tránscritos que dan proteína funcional son PIAS2-204 que origina la proteína PIAS2 beta (PIAS2b), PIAS2-201 que origina la proteína PIAS2 alfa (PIAS2a) y PIAS2-215 que origina una proteína pequeña llamada PIAS2 isoforma 8 o PIAS2 NY. Si vamos a la base datos NCBI encontramos registrados 29 transcritos, 22 codificantes NM_ y 7 no codificantes NR_PIAS2 no estaba estudiado en tiroides y nuestro resultado del análisis de proteómica indicaba que podía ser una proteína con expresión diferencial. Decidimos empezar su estudio detallado siguiendo nuestro objetivo inicial.

Las proteínas PIAS2: caracterización y validación de dos anticuerpos.

PIAS2b y PIAS2a son dos proteínas idénticas en los primeros 551 aminoácidos. Se reconocen varios dominios funcionales en esta secuencia (Uniprot, https://www.uniprot.org/uniprot/O75928):

- -el dominio N-terminal SAP (aa.11-45) formado por dos conjuntos de residuos hidrofóbicos alternados con polares muy conservados separados por una glicina. Su acción sería de unión al DNA y organización de la cromatina. Incluye en su interior un subdominio LXXLL que se ha revelado importante para la interacción con otros factores de transcripción en otras proteínas.
- -el dominio PINIT (aa. 331-408) formado por dos hojas beta anti-paralelas. Sirve como punto de anclaje del sustrato para promover la sumoilación en lisina.
- -el SP-RING (aa. 331-408): dominio común a las proteínas Siz y PIAS, de ahí viene su nombre. Se diferencia de los clásicos “RING fingers” característicos de las E3

ubiquitina ligasas en que sólo contienen un ión Zn2+ en vez de dos. De esta forma funciona como E3 ligasa, pero de SUMO, no de ubiquitina. Por el SP-RING las proteínas PIAS se unen Ubc9 (UBE2I) que es una E2 sumo-ligasa;

- -el sitio consenso de unión a SUMO (aa. 467-473)
- -la secuencia de localización nuclear, NLS (aa. 484-492).
- -A partir del aminoácido 551, la isoforma PIAS2a tiene una pequeña cola hasta su aa. 572 terminal. Pero, sin embargo, PIAS2b tiene otro dominio importante, el Dominio Carboxiterminal-Rico en Serina (Ser-rich Domain) aa. 571-612, en cuyo interior tiene un subdominio con una serie de siete serinas seguidas (Poly-S).

Como se desconocía qué anticuerpos estaban validados y para qué técnicas, durante este estudio se han probado hasta siete anticuerpos distintos (ver métodos, y datos no mostrados). De ellos sólo hemos caracterizado dos, ya que los demás no parecían reconocer verdaderamente PIAS2 en nuestros controles positivos de sobreexpresión de las dos isoformas por separado.

El epítopo del anticuerpo monoclonal ratón anti-PIAS2 (mPIAS2) estaba localizado entre los aa. 518-540 y por tanto era común a PIAS2b y PIAS2a. El epítopo del anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-PIAS2 beta (rPIAS2) estaba localizado en la región rica en Serinas, exclusiva del extremo C-terminal de PIAS2b. rPIAS2 había sido validado para inmunohistoquímica por el consorcio Atlas (Human Protein Atlas, https://www.proteinatlas.org), pero no para otras técnicas.

Como controles utilizamos proteínas sobreexpresadas con un epítopo FLAG N-terminal humanas (FLAG-hPIAS2b y FLAG-hPIAS2a) (Arora et al, J. Biol. Chem. 2003, 278(24):21327-30). Ambos constructos fueron secuenciados íntegramente por nosotros, además de venir validados por secuenciación completa del banco de plásmidos Addgene. También tuvimos otro control sobreexpresando la proteína quimera EGFP-hPIAS2b (Galanti et al, Nature, 2009, 462(7275):935-9).

Expresión de PIAS2 en tejidos de tiroides de pacientes

Una vez validados los anticuerpos, quisimos también poder cuantificar expresión de RNA en tejidos. Diseñamos unos ensayos TaqMan que nos permitiesen medir de forma cuantitativa la expresión de mRNA de todas las isoformas de ARN codificantes en conjunto (global PIAS2) y de cada una de las isoformas PIAS2b y PIAS2a. Nuestra serie de tejidos

de la colección TIROCHUS (en colaboración para los casos de anaplásico con el grupo de la Dra. Laura Fugazzola, Department of Endocrine and Metabolic Diseases Universidad degli Studi de Milano) contaba con 29 tejidos normales (NT), 33 bocios multinodulares (enfermedad proliferativa benigna, MNG), 23 carcinomas diferenciados tipo papilar (PTC) de diversas variantes histológicas, 9 carcinomas pobremente diferenciados (PDTC) y 15 carcinomas anaplásicos o indiferenciados (ATC) (Figura. 3-A). Como control técnico de las múltiples PCRs utilizamos una muestra comercial de mRNA de tejido normal de tiroides que se incluía en todos los platos de reacción.

Global PIAS demostró una expresión abundante del gen en todos los grupos de tejidos excepto en ATC, dónde se expresaba cuantitativamente menos con una diferencia estadística de p=0,09.

Mientras los NT y MNG expresaban los mismos niveles de PIAS2b, los PTC expresaban de forma significativa más PIAS2b. Por otra parte, PDTC y ATC expresaban de forma significativa mucho menos PIAS2b (Figura 3-A izquierda abajo).

PIAS2a se expresaba en menor cantidad que PIAS2b, pero de nuevo se expresaba significativamente en mayor cantidad en PTC que en cualquier otro grupo. Como se expresaba poco en los demás, no encontramos diferencias significativas en PDTC o ATC (Figura 3-A derecha).

Cuando comparamos 8 parejas de tejido NT/PTC procedentes del mismo paciente encontramos que PIAS2b está incrementado en todos los casos, pero no era así con PIAS2a. (Fig. 3-B).

Validación del modelo de líneas celulares comerciales de cáncer de tiroides

Para empezar nuestro estudio funcional elegimos como primer modelo líneas celulares de carcinoma de tiroides de distintos orígenes tumorales y distinto *background* genético. Las líneas fueron validadas siguiendo las indicaciones del ICLAC (https://iclac.org/) pero con nuestro propio sistema empleado previamente basado en 16 STRs. Los datos coincidieron con lo descrito en las compañías proveedoras (DSMZ, ECACC) y en el consorcio Cellosaurus (https://web.expasy.org/cellosaurus/).

Las líneas fueron elegidas de forma que viniesen de pacientes y que no estuvieran modificadas genéticamente. Además, que representasen las categorías patológicas claves de carcinoma de tiroides. Así, las FTC-238 representan al carcinoma diferenciado folicular de

tiroides (FTC) de un paciente hombre de 42 años, aunque vienen de una metástasis pulmonar que es característica de estos cánceres (Goretzki et al, Karger Publisher, 1989, 18:56-80; Goretzki et al. Recent Results Cancer Res., 1990, 118:48-63). Las BCPAP vienen de un carcinoma pobremente diferenciado (PDTC) metastásico de una mujer de 76 años, pero que tenía un componente papilar (PTC) (Paulin et al, C. R. Acad. Sci. III, 1992, 315(12):493-8). Por otra parte, las cuatro líneas de carcinoma anaplásico (ATC) fueron seleccionadas por representar distintos *background* genéticos: las 8305C provienen de una mujer japonesa de 85 años (Ito et al, INt. J. Oncol., 1994, 4(3):583-6), las CAL-62 vienen de una mujer caucásica francesa de 70 años (Gioanni et al, Bull Cancer, 1991, 78(11):1053-62), las BHT-101 vienen de una mujer caucásica húngara de 63 años (Palyi et al, Virchows Arch B Cel Pathol. INcl. Mol. Pathol. 1993, 63(4): 263-9), y las MB-1 vienen de un varón de 57 años caucásico de Suiza (Stenner et al, Cancer Sci. 2008, 99(9): 1847:52).

En la Tabla 3 se recogen las mutaciones conocidas más características de estas líneas comerciales (Cellosaurus, https://web expasy org/cellosaurus/).

Tabla 3: Líneas celulares comerciales utilizadas y sus características.

Línea	Estatus genético comprobado	Paciente origen	Patología de origen
FTC-238	TP53 R273H; TERT G228A Het	Varón, 42 años. Caucásico alemá	FTC, metástasis pulmonar
BCPAP	BRAF V600E Hom; TERT G228A Het	Mujer, 76 años Caucásica francé	PDTC/ PTC
8305C	BRAF V600E Het; TP53 R273C; TERT G250A Het	Mujer, 85 años Asiática, japones	ATC
CAL-62	KRAS G12R; TP53 A161D; TERT promoter wt	Mujer, 70 años Caucásica francé	ATC, lóbulo derecho tiroides
BHT-101	BRAF V600E Het; TERT G228A Het	Mujer, 63 años Caucásica húnga	ATC, metastasis linfática (previo PTC)
MB-1	wtBRAF; TP53 A161D; TERT promoter under study	Varón, 57 años Caucásico suizo	ATC, masa retroesternal

Las líneas fueron cultivadas con nuestro medio h7H aunque viniesen de otros tipos de medio, puesto que consideramos que por una parte es más apropiado para estudios funcionales ya que se parece más al medio interno humano, y por otra parte necesitábamos igualar las condiciones de crecimiento en líneas celulares comerciales con nuestros cultivos primarios. Las líneas conservaban ciertas características esperables, como por ejemplo las células gigantes en las líneas de anaplásico, una característica observada en las muestras de tejido de los pacientes.

La eficiencia de transfección con los dos mejores métodos de transfección de las líneas de anaplásico que fueron estandarizados a partir de una batería de lípidos o nucleofección para conseguir el máximo de eficiencia (datos no mostrados). Los lípidos testados fueron Fugene 6, Fugene 6HD, K2, Turbofect y Viafect. Sólo estos dos últimos permitieron alcanzar el grado de eficiencia necesario para nuestros propósitos.

Efecto de la represión de PIAS2b con dsRNAi en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de tiroides

Se decidió comenzar un estudio de la función de PIAS2 en células de tiroides humano. Primero medimos la expresión de RNA de PIAS2 en todas sus isoformas (global), y específicamente de las isoformas PIAS2a y PIAS2b por qRT-PCR cuantitativa TaqMan, comparando líneas con el cultivo primario de tiroides normal humano T-NT2, que crece durante muchos pases (Bravo et al, 2012; Garcia-Rendueles et al, Oncogene, 2017, 36(5):652-666) (Fig. 4-A). Como se puede observar, la expresión global no siempre coincide con la de las isoformas proteicas. Excepto en las MB-1 y 8305C que tienen abundancia de ambas isoformas PIAS2b y PIAS2a, las líneas de cáncer de tiroides expresan menos PIAS2b y PIAS2a que el cultivo celular normal T-NT2. En general, PIAS2a está menos expresado que PIAS2b, algo que coincide con los estudios caracterizando los anticuerpos mostrados en la Figura 5, donde no se detectó banda de PIAS2a en el peso esperado.

Para saber la función de una proteína, lo más directo es inhibir su expresión y observar si existe algún efecto en proliferación o fenotipo. Para inhibir la expresión se necesita interferencia con el mRNA (RNAi), pero en el caso de PIAS2 debe ser específico de isoforma, ya que nosotros ya sabíamos que interferiríamos con PIAS2b puesto que era la que veíamos diferencialmente expresada en los tejidos (Fig. 3). Como todos los RNAi comerciales inhibían muchas de las isoformas de PIAS2 decidimos diseñar nosotros RNAi basándonos en los datos esenciales requeridos para una secuencia de RNAi eficiente: 21 nucleótidos, que comience por AA (termine en UU en el RNA, 3' UU *hanging end*), no tenga un % GC excesivamente alto y no tenga más de tres nucleótidos iguales seguidos. Como la región diferente de PIAS2b es la final, nuestras secuencias se concentraron en la 3' UTR, localizadas en el exón 14 de PIAS2b (Fig 4-B).

Tabla 4. Diseño y secuencias de dsRNAi para PIAS2 y de la secuencia control sin diana (off-target), y localización en el PIAS2b 3' UTR

dsRNAi Nar	siRNA Target Sequer	Antisense/Sense siRNA Oligonucleotide Template (siRNA Template Design Tool, Ambior	GC%	dsRNAi sequence
PIAS2b dsRNAi 1	AATAATTTGGTATTTATTG A	5'- AATAATTTGGTATTTATTGAACCTGTCTC -3 5'- AATTCAATAAATACCAAATTACCTGTCTC-3'	27,5	5'- UAAUUUGGUAUUUAUUGAAc 3' 3'- uuAUUAAACCAUAAAUAACUU 5'
PIAS2b dsRNAi 2	AACAAGAACCAAATGACA C	5'- AACAAGAACCAAATGACATGCCCTGTCTC - 5'- AAGCATGTCATTTGGTTCTTGCCTGTCTC -3	44,8	5'- CAAGAACCAAAUGACAUGCuu 3' 3'- uuGUUCUUGGUUUACUGUAC 5'
PIAS2b dsRNAi 3	AATTTGGTATTTATTGAAA T	5'- AATTTGGTATTTATTGAAAGTCCTGTCTC -3 5'- AAACTTTCAATAAATACCAAACCTGTCTC -3		
PIAS2b dsRNAi 4	AACCATAACTGTATCTTCC G	5'- AACCATAACTGTATCTTCCTGCCTGTCTC -3 5'- AACAGGAAGATACAGTTATGGCCTGTCTC -		
PIAS2b dsRNAi 5	AATGGATGGAGTCTACAA C	5'- AATGGATGGAGTCTACAAATCCCTGTCTC - 5'- AAGATTTGTAGACTCCATCCACCTGTCTC -3		
ns-dsRNAi-	AAGCGCGATAGCGCGAAT A	5'-AAGCGCGATAGCGCGAATATACCTGTCTC-3' 5'-AATATATTCGCGCTATCGCGCCCTGTCTC-3'	55,6	5'- GCGCGAUAGCGCGAAUAUAuu 3' 3'- uuCGCGCUAUCGCGCUUAUAU 5'

PIAS2b UTR:
TCAGATTTGCCAGgTTTGGATTTTCTTTCCCTTATTCCAGTTGATCCCCAGTACTGTCCTCCTATGTTTTTGGATAGTCTCACCTCACCCTTA
CAGCAAGCAGTACGTC
TGTCACCACCACCAGCTCCCATGAAAGCAGTACTCATGTTAGTTCATCCAGCAGCAGGAGTGAGACAGGGGTCATAACCAGCAGTGGAAG
AACATTCCTGACATCAT
CTCATTGGACTAA**AGGAGGACTCACTTGATTCTGGGAATCATTCATCAGAACTGCTTTTTCTTGGATCTCTAGTCTGTGGAAACGTTCTT**
TTTTTTTTTTT
TTAAT*AATTTGGTATTTATTGAA*AGT**CAGATGGATTCTTTTGCTTTCTGAGGGGTGAACACAGAAGACTGC**AACAAGAA
AAATGACATGCAA
GGATTTTTCTTAATTATGCTGTACTCTCAGCATCAGATACATTC*AACCATAACTGTATCTTCCTG***AGAGATGGATTTCACTTTCA**
ACGT
T*AATGGATGGAGTCTACAAATC***AGTGAAAAAAGTTTTTGTTAAAATAAAGAGCAATAAAATTA**

Minúscula: nucleótido g donde empieza el Exon 13 diferencial específico de PIAS2b.
Blanco: nucleótido T donde empieza el Exon 14 específico de PIAS2b.
Ampliado: Codón de stop de traducción TAA;
Grande y Subrayado 1: PIAS2b dsRNAi 1;
Grande y Subrayado 2: PIAS2b dsRNAi 2
Grande y Cursiva 1: PIAS2b dsRNAi 3 (se superpone con la 1 parcialmente);
Grande y cursiva 2: PIAS2b dsRNAi 4;
Grande y cursiva 3: PIAS2b dsRNAi 5.

Para hacer el diseño utilizamos el siRNA Template Tool de Ambion (http://www.ambion.com/techlib/misc/silencer_siRNA_template.html. Y para sintetizar el dsRNAi utilizamos su kit de transcripción *in vitro* basándonos en la T7 polimerasa. La aplicación web nos encontró cinco secuencias con nuestras condiciones (Tabla 4).

Las secuencias de 19 nucleótidos fueron blasteadas para comprobar que su único tránscrito reconocido con un Total score >31y un E-value <1 fuese PIAS2b (datos no mostrados). Como podemos observar en la Figura 5, las secuencias reconocen sólo PIAS2-204 (PIAS2b) y PIAS-202, una de las isoformas no codificantes (Se muestran sólo las que se han utilizado en este trabajo).

Ningún otro ARNm humano superó nuestros criterios en ninguna de las 5 secuencias (datos no mostrados). La secuencia control ns-dsRNAi no superó en ningún target con Total score >24 y E-value <111.

Seleccionamos de forma empírica para transfectar en las células las dos primeras secuencias PIAS2b dsRNAi 1 y 2 razonando que la secuencia 1 se superponía parcialmente en la misma secuencia con la 3, por lo que descartamos esta última; y las secuencias 4 y 5 estaban mucho más terminales y pudiera haber alguna estructura secundaria de la cadena de mRNA a este nivel que impidiera su unión (Tabla 4).

Medimos si la transfección de la secuencia PIAS2b dsRNAi 1 comparada con la secuencia control ns-dsRNAi reprimía la expresión de PIAS2b o PIAS2a por TaqMan, pero el número de valores indetectables en las muestras PIAS2b dsRNAi 1 fue tan numeroso que impedía hacer estadística (datos no mostrados). Utilizamos entonces un sistema de qRT-PCR cuantitativa basado en Sybr que es menos específico, pero más sensible (Fig 4-C). PIAS2b dsRNAi 1 reducía de forma eficiente, significativa y específica la expresión del mRNA de PIAS2b, pero no de PIAS2a en las cinco líneas celulares (Fig 4-C). El mismo resultado se obtuvo al medir por western blot la expresión de la proteína, tanto con mPIAS2 como con rPIAS2 (Fig 4-D). Al cuantificar los westerns blot se observó que en todas las líneas celulares se reprimía p75 mPIAS2 tras el tratamiento con PIAS2 dsRNAi 1, aunque en la línea BCPAP la represión era significativamente menor que en las demás líneas tanto a uno como a dos días tras la adición del dsRNAi.

La eficacia de transfección fue superior al 75% en FTC-238, BCPAP, 8305C y CAL-62, y mayor al 50% en BHT-101 y MB-1 (Fig.4-E). Sin embargo, el efecto funcional que tuvieron nuestros dsRNAi en el crecimiento celular fue diverso dependiendo de la secuencia y del origen de las líneas.

En la línea de carcinoma diferenciado folicular FTC-238 ninguna secuencia tuvo efecto (Fig.4-E). En la línea de carcinoma pobremente diferenciado BCPAP la secuencia 1 no tuvo efecto, pero la secuencia 2 o la suma de 1+2 tuvieron un significativo efecto antiproliferativo (Fig.4-F). En las cuatro líneas de carcinoma anaplásico -8305C, CAL-62, BHT-101 y MB-1- las dos secuencias tuvieron un marcado efecto antiproliferativo (Fig.8-G).

Aunque había pocas diferencias en el marcado efecto antiproliferativo entre los tres tratamientos en las líneas de anaplásico, la secuencia que tuvo el efecto más potente, duradero y consistente en las cuatro líneas anaplásicas fue PIAS2b dsRNAi 1, por lo que continuamos caracterizando su efecto en cultivos primarios de nuestra colección TIROCHUS.

Los cultivos primarios son mantenidos en condiciones humanizadas (medio h7H) y estandarizados de la misma forma que las líneas celulares. Además, cuando disponemos de él, crecemos en paralelo tejido normal o benigno y tejido canceroso procedentes del mismo paciente. En la Fig.6 podemos observar unos ejemplos provenientes de casos de carcinoma anaplásico. En la Tabla 5 podemos observar el perfil genético de algunos cultivos comparando el cultivo normal con el canceroso, y a su vez con su tejido original de donde fueron crecidos. Vemos que la conservación del perfil genético es absoluta, aunque en los cánceres anaplásicos tenemos pequeñas variaciones esperadas por cierta heterogeneidad tumoral en un cáncer tan agresivo. Aunque, los estudios de secuenciación masiva han encontrado que, en cáncer de tiroides, y probablemente los datos se refieran a carcinoma diferenciado y pobremente diferenciado, la carga de mutaciones por tumor (*mutational burden*) no es demasiado intensa (Williams et al, Nat. Genet. 2016, 48(39): 238-244; Martincorena et al, Cell, 2018, 173(7):1823). En un estudio donde se comparan la carga global de mutaciones en cánceres de muchos órganos, el carcinoma de tiroides estaba entre los más bajos con alrededor de 1,5 mutaciones/10^{-7} bases/división frente al carcinoma de pulmón por ejemplo con casi 1 mutación/10^{-6} bases/división (Williams et al, Nat. Genet. 2016, 48(39: 238-244). En otro estudio posterior donde estudiaban exclusivamente las sustituciones se encontró que el cáncer de tiroides tiene <1 sustitución /tumor en oncogenes "driver" frente a por ejemplo el cáncer de colon o endometrio con 4 sustituciones/tumor en oncogenes "driver, y centrándose en la región codificante exclusivamente el cáncer de tiroides tenía <1 sustitución codificante/tumor en oncogenes "driver" frente a >10 sustituciones codificantes/tumor en oncogenes "driver" en carcinoma de colon, endometrio o melanoma (Martincorena et al, Cell, 2018, 173(7):1823).

Tabla 5. Perfil genético de algunos cultivos (T-) comparados con sus tejidos de origen (TH). Cursiva o subrayado, cultivos de un mismo paciente. (NT, Tiroides normal; MNG, bocio multinodular; FC, carcinoma diferenciado folicular; UC, carcinoma anaplásico). Alelos en negrita en la tabla, variaciones encontradas en el cultivo (T-) respecto al tejido de origen (TH). En la última fila se resumen las variaciones encontradas en el perfil genético.

		T-NT2 (p5)	TH-FC7 — T-FC7 (p14)	*TH-MNG94 — T-MNG94 (p3)*	*TH-UC1 — T-UC1 (p4)*	*TH-UC2 — T-UC2 (p4)*	TH-MNG170 — T-MNG17 (p4)	TH-MNG17 — T-MNG178 (p4)	TH-MNG179 — T-MNG179 (p4)	TH-UC3 — T-UC3 (p7)
Marcadores (Identifiler Plus Panels v1)	**D8S1179**	12,14	13,14	13,14	13,14	13,14	14	10,11	10,11	10,11
	D21S11	29.32.2	30,31	28	28	28	27,28	29,32.2	29,32.2	**29**,32.2
	D7S820	11.12	10,12	9	9	9	9,10	11,12	11,12	11,12
	CSF1PO	11,12	10,11	10,14	10,14	10,14	12	10,11	10,11	10,11
	D3S1358	16	15,17	15,17	15,17	15,17	14	17	17	17
	TH01	9.3	7,9.3	9.3	9.3	9.3	6,8	8,9	8,9	8,9
	D13S317	11	11,12	11,12	11,12	11,12	11	13,14	13,14	13,14
	D16S539	12	11,13	11,13	11,13	11,13	13,14	10,12	10,12	10,12
	D2S1338	17,25	23,25	19,22	19,22	19,22	16,17	18,23	18,23	18,23
	D19S433	14	13	14,15	14,15	14,**14.2**	14,15.2	13,15	13,15	13,15
	vWA	15,20	15,17	13,16	13,16	**10**,13	16,17	15	15	15
	TPOX	8,9	9,12	8	8	8	9,10	8,12	8,12	8,12
	D18S51	15,19	17,19	16	16	**10.2,12.2**	17,21	17,19	17,19	17,~~19~~
	AMEL	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	D5S818	13	10,12	11,12	11,12	11,12	11,12	12	12	12
	FGA	22	22,23	22,23	22,23	21,22	21	19,25	19,25	19,25
	Id Tur Original		SI	SI	SI	22 SI + 4 de novo	SI	SI	SI	26 SI + 2 perdidos

Como habíamos hecho anteriormente con las líneas celulares, lo primero fue evaluar la expresión de RNA de PIAS2 global, y de las isoformas PIAS2b y PIAS2a en cultivos de diferente origen que teníamos en ese momento en cultivo (Fig.7-A). Esta medición nos indicó que se deben expresar varias isoformas codificantes y no codificantes ya que PIAS2 global no coincide con el TaqMan específico para cada una de las isoformas codificantes. De nuevo, observamos que se expresa más PIAS2b que PIAS2a, pero que los cultivos anaplásicos expresan menos PIAS2 que los de otros orígenes como tejido normal (T-NT), bocio multinodular (T-MNG) o carcinoma diferenciado papilar (T-PC). Para confirmar este dato, medimos los grupos de cultivos establecidos de un mismo origen tisular como tejido normal de tiroides (T-NT, n=15), bocio multinodular (T-MNG, n=27), carcinoma papilar (T-PC, n=24) y carcinoma anaplásico (T-UC, n=3 con replicados en distintos pases hasta 24 muestras). El grupo de cultivos anaplásicos tenían significativamente menos expresión global de PIAS2, y de PIAS2b y PIAS2a que los otros dos grupos (Fig.7-B). El grupo de T-PC tenía significativamente más PIAS2b (Fig 7-B).

Pasamos entonces a probar el efecto de nuestra secuencia. La transfección de PIAS2b dsRNAi 1 fue capaz de reprimir la expresión de la proteína de forma efectiva en cultivos de diferente origen patológico (tejido normal de tiroides, bocio multinodular, carcinoma diferenciado papilar y carcinoma anaplásico), mientras que la secuencia control nd-dsRNAi no tenía efecto (Fig.7-C-F). Cuando lo comprobábamos a nivel de mRNA, la represión inducida por PIAS2b dsRNAi 1 era específica para la isoforma beta, sin alterar PIAS2a, (Fig.7-G).

Medimos el efecto biológico sobre el crecimiento de los cultivos a seis días tras la transfección, controlando que él % de células transfectadas fuera mayor del 50% en todos los casos, y en algunos cercano al 100% (Fig.11-H). Observamos que no había efecto ni diferencias entre PIAS2b dsRNAi 1 frente a nd-dsRNAi en cultivos de origen tiroides normal (T-NT), ni de hiperplasia autoinmune de Graves-Basedow (T-GD), ni de bocio multinodular (T-MNG), ni de carcinoma diferenciado papilar (T-PC) aunque fuese metastásico (T-M), ni de carcinoma diferenciado folicular (T-FC) (Fig.7-H). Sin embargo, en los tres cultivos anaplásicos establecidos a partir de fragmentos quirúrgicos independientes de dos pacientes afectos, PIAS2b dsRNAi 1 tuvo un efecto masivo y significativo inhibiendo el crecimiento celular en más de un 90% a seis días tras la transfección (Fig.7-H). Con algunos cultivos repetimos el experimento midiendo a lo largo de los días a partir de la transfección, y comprobamos que las células transfectadas con ns-dsRNAi crecían a lo largo de los días, como también lo hacían las transfectadas con PIAS2b dsRNAi 1 en T-NT2 o T-MNG94,

pero no así en los tres cultivos anaplásicos T-UC1, T-UC2 y T-UC3 que desde el día 1 comenzaban a disminuir el número de sus células (Fig.7-I-J).

Una de las preguntas que nos hicimos fue ver cuánto duraba el efecto de una única transfección de PIAS2 dsRNAi 1 en una línea celular anaplásica, y cuando comenzaban a recuperarse teniendo en cuenta que estas células anaplásicas proliferan de forma rápida e incontrolada. Realizamos un experimento en CAL-62 comparando día a día el crecimiento celular (datos no mostrados). El efecto dura días, aunque a partir del día 5 se observa una recuperación lenta del crecimiento. Esto sugiere que tratando las células una vez por semana, como se hace en varias quimioterapias, podríamos tener posibilidades de control de estas células.

Para saber qué les pasaba a las células tratadas con PIAS2b dsRNAi realizamos experimentos de video-microscopía donde las células se observaban durante días creciendo en condiciones de humedad y temperatura controladas, y en presencia de una pequeña cantidad de un colorante no tóxico, SiRDNA, que cada vez que una célula duplica u DNA y lo condensa en mitosis se vuelve más intenso, para reducir su intensidad después de la mitosis. De esta forma, se puede seguir cada célula individualmente. En la Figura 8 se muestran los resultados. En las células anaplásicas de pacientes T-UC1, T-UC2 y las líneas celulares 8305C y CAL-62, la secuencia PIAS2 dsRNAi 1 es citotóxica debido a que provoca catástrofe mitótica o muerte durante la mitosis (Fig 8A-B-C-D, gráficas superiores, barras negras). Frente a ello, las células tratadas con la secuencia control ns-dsRNAi proseguían sus divisiones sin problema (Fig 8A-B-C-D, gráficas superiores, barras blancas). Cuando se analizaron las células se pudo demostrar que las células se morían al principio de la mitosis, justo a la entrada en profase (Fig 8A-B-C-D, gráficos inferiores). En la línea BCPAP se obtuvieron resultados similares pero con las secuencia PIAS2 dsRNAi 2 (Fig 8-E).

Nuestra conclusión es que la expresión de PIAS2 en células anaplásicas de tiroides está muy constreñida y su disminución (dsRNAi) o aumento (sobreexpresión) provoca muerte de forma específica en mitosis en este tipo de células cancerosas sin afectar a las células de cáncer diferenciado, proliferación benigna o tiroides normal.

Efectividad de otros métodos comerciales para reprimir la expresión de PIAS2b

Nuestra secuencia PIAS2 dsRNAi específica de isoforma tenía un efecto anticanceroso potente y específico de células anaplásicas. Nuestro siguiente paso fue preguntarnos si era importante que la secuencia fuera dirigida a la isoforma PIAS2b y si era

importante la forma en la que la producíamos, como doble cadena de RNAi transcrita *in vitro*. Este sistema es además tedioso de producir a gran escala.

Buscamos otros sistemas comerciales que técnicamente fuesen compatibles y funcionales en células que creciesen de forma muy rápida como son las células anaplásicas. Tras evaluar varios sistemas seleccionamos la represión de PIAS2b tras infección viral y expresión inducida de un hairpin shRNA.

El sistema inducible TRIPZ-human shRNA (Dharmacon, ver bibliografía) permite la generación de lentivirus que infectan a las células. Tras la administración de una dosis de Doxiciclina compatible con el crecimiento celular, se induce la expresión del shRNA hairpin (*Tet-on*) al mismo tiempo que se induce la expresión de la proteína fluorescente roja (RFP). El sistema está basado en un vector lentiviral que contiene un promotor regulado por "tetraciclina" (*Tre promoter*) que dirige la expresión de tránscrito de fusión RFP-shRNA, con el shRNA actuando como 3'UTR (Naughton et al, 2011, Anal. Biochem. 417(1):162-4). El vector tiene dos sitios BspQ1 entre la región 5'mir30 y 3'mir30 donde se clonan con cierta facilidad oligonucleótidos de doble cadena con las secuencias shRNA. El vector tiene un segundo promotor de la Ubiquitin C (*UBC promoter*) que dirige la expresión del transactivador rtTA3 regulado por la Doxiciclina/Tetraciclina, asociado a un IRES y el gen de la resistencia a puromicina (*puromycin N-acetyl-transferase, PAC*).

Compramos pues los dos plásmidos T-PIAS2_shRNA y T-Scr_shRNA que contenía la secuencia control recomendada sin diana *Scramble (*Scr, *off-target*). Mediante vectores complementarios de Addgene, preparamos en nuestro laboratorio partículas virales de alto título, medido por PCR cuantitativa y ensayos funcionales en HEK293T. Mientras tanto mediante un experimento dosis-respuesta con Doxiciclina en nuestras células de cáncer de tiroides anaplásico (CAL-62) buscamos concentraciones que no afectasen el crecimiento celular (1 y 2 microg/ml).

En un primer experimento infectamos a las células CAL-62, y seleccionamos con Puromicina. Los clones resistentes se mezclaron en poblaciones que, en el siguiente pase, se compararon en ausencia/presencia de Doxiciclina. Desgraciadamente, la variabilidad de expresión de RFP fue muy grande con células muy intensas y células absolutamente negativas, a pesar de la selección con Puromicina.

Decidimos entonces utilizar selección por *sorter* tras citometría de flujo. Tras añadir Doxiciclina (o no a los controles de fluorescencia) durante la noche, al día siguiente seleccionamos dos poblaciones que tuviesen alta intensidad de RFP (T-PIAS2_shRNA$_{HI}$ y una segunda población todavía con más intensidad T-PIAS2_shRNA$_{SU}$. Lo mismo hicimos

con la población control T-Scr_shRNA, aunque nunca tuvimos ninguna diferencia posterior entre ellas en crecimiento a lo largo del tiempo, por lo que sólo se usó una para los experimentos (datos no mostrados).

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos de los subsiguientes experimentos con estas poblaciones. La adición de Doxiciclina tuvo un significativo efecto inhibidor del crecimiento en las dos poblaciones que expresan PIAS2_shRNA, pero no en las que expresan Scr_shRNA (Fig. 9-A). El máximo efecto es de un 75% de inhibición a los 7 días con la máxima dosis de Doxiciclina.

La secuencia PIAS2_shRNA está dirigida a la parte codificante común a todas las isoformas proteicas del RNA de PIAS2; buscada en BLAST sería capaz de interactuar contra 5 de las 16 isoformas de PIAS2, todas codificantes PIAS2-204 (PIAS2b), PIAS2-201 (PIAS2a), PIAS2-215 (PIAS-NY), PIAS2-203 (fragmento de 282 aa) y PIAS2-202 (fragmento de 182, *nonsense mediating decay*). De hecho, al medir por qRT-PCR TaqMan la expresión de RNA específico de isoforma vimos que la Doxiciclina reprime la expresión de PIAS2b y PIAS2a en la población T-PIAS2$_{HI}$_sh, pero no en la población T-Scr_sh (Fig. 9-B). Mediante western blot vimos que había represión de la proteína PIAS2b tanto con el anticuerpo mPIAS2 como con el rPIAS2, (Fig. 9-C).

Quisimos observarlas en experimentos a más largo plazo, ya que se supone que la población está continuamente expresando el shRNA que interfiere con PIAS2. El efecto se mantiene durante 7 días tras añadirle la Doxiciclina, pero sin embargo, tras 9 días se pierde el efecto (Fig 9-D).

Al observar que PIAS2b dsRNAi 1 era la forma más eficiente de reprimir PIAS2b con un importante efecto funcional anti-proliferativo continuamos el resto de nuestros estudios con esta formulación.

PIAS2 dsRNAi 1 tiene efecto antitumoral en oPDX, un modelo preclínico in vivo

El dsRNAi PIAS2 tiene un comportamiento antitumoral específico en células anaplásicas de tiroides in vitro. Decidimos entonces desarrollar un modelo in vivo que tuviese relevancia con la clínica.

Las células de cáncer anaplásico se infectan mal con virus siguiendo los protocolos habituales. Desarrollamos un vector viral con doble expresión de la enzima Luciferasa y mCherry separadas por un elemento IRES (*Internal Ribosomic Entry Site*) que asegura que aproximadamente por cada molécula de mCherry va a transcribirse una molécula de Luciferasa. De esta forma, es posible evaluar de forma rápida infección viral de la población

por microscopía de fluorescencia convencional y a su vez asegurar la cuantificación posterior de la masa tumoral mediante luminiscencia.

En la Figura 10 se resume el desarrollo del modelo. Con el más eficiente protocolo de infección, una gran parte de las células expresan proteína fluorescente mCherry frente a las no infectadas (Fig 10-A). Estas mismas células emiten luz tras la adición de luciferina ya que expresan la proteína luciferasa combinada en el mismo virus y puede ser observada en el IVIS (Fig 10-B) y cuantificada de forma subsiguiente (Fig 10-C).

Las células se introducen de forma cuidadosa por vía quirúrgica paralela a la tráquea por debajo de los músculos laríngeos en ratones NOD-SCID hembra. Y se dejan recuperar por al menos dos semanas. Tras ese período, comienza la evaluación del crecimiento tumoral en el IVIS tras anestesia gaseosa rápida e inyección de luciferina *i.p.* (Fig 10-D). Podemos observar como el modelo es reproducible, ortotópicamente localizado y adquiere el punto máximo de medida entre los 20-30 minutos tras la inyección del sustrato luciferina.

Una vez validado el modelo animal se estudió la acción anticancerosa in vivo de PIAS2 dsRNAi 1. Para ello en 9 ratones NOD-SCID hembra se inyectaron 10^6 células del cultivo primario anaplásico T-UC1 infectadas con el virus MI-luciferase-IRES-mcherry generando xenoinjertos ortotópicos derivados de paciente (oPDX).

El crecimiento de los tumores se ha seguido una vez a la semana midiendo la bioluminiscencia a través del aparato IVIS (Perkin Elmer). Se dejaron crecer los tumores hasta las 5 semanas cuando los ratones presentaban grandes masas en el cuello y en ese momento se han empezado a tratar. Los ratones fueron randomizados para tratarse por vía sistémica 2 veces a la semana durante 3 semanas con 40uM dsRNAi (ns-dsRNAi o PIAS2b dsRNAi 1) mezclado con el vehículo Atelocollagen(Azuma K et al, Biochem. BIophys. Res. Commun. 2010, 391(1): 1075-9; Sasaki T et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010, 399(1):79-83) (AteloGene koken, Cosmobio). (Fig 11-A).

Este tipo de vehículo permite que *in vivo* los dsRNAi sean estables. Los complejos que forman con los dsRNAi protegen la degradación de los ácidos nucleicos por las nucleasas. Se trataron 4 ratones con la mezcla PIAS2b dsRNAi y Atelocollagen y 5 ratones con la mezcla ns-dsRNAi y Atelocollagen. Terminado el tratamiento se esperó una semana y se procedió al sacrificio de los ratones y recogida de muestras (Fig 11-A).

Las curvas de evolución individuales de bioluminiscencia, obtenidas semanalmente por el IVIS, han sido ajustadas al 100% a la semana 5 en la que se comenzó el tratamiento. El análisis estadístico de los datos por ANOVA de medidas múltiples muestra una diferencia significativa al final del tratamiento ($p=0,01$) (Fig. 11-B).

Para la evaluación de la respuesta final se usaron los criterios RECIST (PD= Progressive disease; SD= Stable Disease; PR= Partial response). (Fig 11-B). Mientras que en el grupo control, ns-dsRNAi, los tumores siguieron creciendo progresivamente (PD), en el grupo tratado con PIAS2b dsRNAi, 3 ratones han sido capaces de estabilizar el crecimiento de sus tumores (SD) y el cuarto ratón pudo reducir parcialmente el volumen del tumor (PR) (Fig 11-B). En la Figura 11-C, se muestran dos casos, uno tratado con ns-dsRNAi donde la señal crece con el tiempo, y uno tratado con PIAS2 dsRNAi 1 donde se observa que la señal decrece con el tratamiento.

También se han obtenido curvas de grupo por regresión no lineal para el ns-dsRNAi y PIAS2b dsRNAi usando el método de regresión LOWESS (Fig 11-B, líneas gruesas). Las curvas LOWESS analizan de forma matemática la tendencia en grupos de datos. Se puede ver como todos los tumores han crecido de forma igual hasta la semana 5 (línea gruesa gris y negra no se separan), pero que tras el tratamiento las dos curvas empiezan a alejarse, la gris (ns-dsRNAi) subiendo en intensidad, la negra (PIAS2 dsRNAi 1) estabilizándose y separándose cada vez más de la gris.

Representando la intensidad inicial antes de tratamiento y la final, al final del tratamiento, en análisis de dato inicial-final (Test de Mann-Whitney), hay una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control de ratones ns-dsRNAi y PIAS2b dsRNAi 1 (Fig 11-D).

En el punto final se realiza autopsia y extracción de los tumores. Se realiza una primera valoración *in situ* para determinar la afectación del crecimiento tumoral a otras regiones. En los ratones control se ve un crecimiento local agresivo, invasión y destrucción de estructuras anatómicas del cuello representativo de los carcinomas anaplásicos humanos. Se realiza un examen *ex vivo* de las dimensiones del tumor donde se observan diferencias a simple vista. Se observa que los tumores de los animales control, ns-dsRNAi son mayores que los ratones tratados con PIAS2 dsRNAi 1 (Fig 11-E). También se realiza un examen macroscópico de los órganos más susceptibles de metástasis como los pulmones, cerebro, corazón e hígado. En ninguno de los grupos aparecieron metástasis aparentes.

Los tumores fueron fijados, seccionados para posterior análisis histológico. Su volumen tridimensional fue calculado a partir de las secciones. Los tumores de los ratones tratados con ns-dsRNAi son más grandes que los tratados con PIAS2b dsRNAi 1 , aunque que las diferencias de volúmenes de los tumores no llegan a alcanzar diferencia estadísticamente significativas (p=0.1) (Fig. 11-F).

En el análisis histológico por Hematoxilina-Eosina se observa invasión del tumor humano en la tiroides normal del ratón, tanto como invasión vascular como muscular reproduciendo las características de los carcinomas anaplásicos humanos de tiroides Fig 11-G). También se han comparado características histológicas por inmunohistoquímica usando anticuerpos clínicamente validados para el diagnóstico de los carcinomas anaplásicos de tiroides. Los tumores presentan positividad para citoqueratinas global (A1A3) y para CK8/CK18 característica del carcinoma anaplásico. El carcinoma es negativo para marcadores de tiroides (Tiroglobulina, TG; NKX2.1, TTF1) pero muy positivo para Ki67, p53 y PAX8 (Fig 11-H). La patología de los tumores ha demostrado similitudes con las características de los carcinomas anaplásicos humanos.

En la Figura 11-I, se han comparado los carcinomas tratados con ns-dsRNAi y PIAS2b dsRNAi 1 contando las células del carcinoma con signos de muerte, semejante a catástrofe mitótica: células de fondo rosa vivo y hematoxilina condensada (puntos y flechas negros) frente a las células totales (puntos grises). Se verificaron diferencias significativas en los carcinomas tratados con PIAS2b dsRNAi 1 que presentan más células muertas.

Efecto de la represión de PIAS2b con dsRNAi en líneas celulares y cultivos primarios de cánceres diferentes al de tiroides

Finalmente, se ensayó la efectividad de PIAS2b dsRNAi 1 como inhibidor del crecimiento de otros tipos de cáncer de orígenes distintos a la glándula tiroides. Para ello se prepararon nuevos experimentos.

Se partió de la hipótesis de que hay tres características de los carcinomas anaplásicos de tiroides que no poseen los carcinomas diferenciados o pobremente diferenciados de tiroides y son: 1) la indiferenciación, revelada por la ausencia de expresión de proteínas u otros marcadores fenotípicos característicos de ese tejido; 2) la severa atipia celular con hechos microscópicos característicos (pleomórficas) llamada “anaplasia”, y 3) las alteraciones genéticas conocidas como “aneuploidia” (contenido >2n) en todas las células, con algunas presentando poliploidia (n*2n) en células “gigantes de anaplásico”. Ambas características podrían o no estar asociadas.

Hay otros cánceres humanos no tiroideos que a nivel de patología clínica presentan estas tres características. Semejantes al carcinoma anaplásico (indiferenciado) de tiroides existen otras neoplasias epiteliales indiferenciadas no neuroendocrinas de alto grado de malignidad con morfología anaplásica (pleomórficas) en diferentes localizaciones anatómicas y que suelen tener en común: edad media de presentación alta (50-60 años), curso

clínico muy agresivo, apariencia sarcomatoide (mesenquimal-like), coexistencia con áreas residuales de carcinoma bien diferenciado y alteraciones en TP53 coexistiendo con alteraciones moleculares en otros genes. Entre ellos están el carcinoma indiferenciado de pulmón (también llamado de célula grande, pleomórfico, fusocelular o de células gigantes), el carcinoma indiferenciado de páncreas, de estómago, de hígado, de ovario, de útero o de próstata.

Para estos estudios, primero se hizo una búsqueda in silico de líneas celulares comerciales cuyo origen fuese un carcinoma indiferenciado del tipo buscado (no tiroideo) pero que conservase las mismas características patológicas del carcinoma anaplásico de tiroides y mantuviese dichas características en la línea cultivada a partir del tejido del paciente inicial. Se seleccionaron tres líneas (ver Tabla 6): PANC-1 derivada de un carcinoma indiferenciado/ anaplásico de páncreas, COR-L23 derivada de un carcinoma indiferenciado/ anaplásico de pulmón de células largas o gigantes, HGC-27 derivadas de un carcinoma indiferenciado de estómago. Igual que las células anaplásicas de tiroides, tras ser establecidas estas líneas fueron descritas con un cariotipo muy alterado con respecto a los 46 cromosomas de las células

El siguiente paso fue la estandarización de la transfección de los dsRNAi para conseguir la máxima eficiencia de transfección exactamente como se había hecho para todas las células de carcinoma anaplásico de tiroides. Se probaron los dos tipos de complejos de lípidos más frecuentemente eficientes en líneas celulares procedentes de dos casas comerciales distintas (Viafect, Promega; y Turbofect, Thermo) buscando al menos > del 70% de las células transfectadas con ns-dsRNAi control mezclado con un plásmido que expresa GFP, lo que permite contar las células con fluorescencia verde y calcular el porcentaje de transfección.

El reactivo más eficiente fue Turbofect para todas las líneas (Tabla 6). Una vez estandarizado, se comparó la acción de los dsRNAi sobre el crecimiento celular de estas líneas. Se comparó la transfección del ns-dsRNAi a la transfección de PIAS2-dsRNAi 1. En la Figura 12 se observa como PIAS2-dsRNAi 1 tiene un efecto específico inhibitorio del crecimiento en las tres líneas cancerosas indiferenciadas / anaplásicas testadas. El efecto es máximo alcanzado en la línea de carcinoma indiferenciado de páncreas PANC-1 es del 62% de inhibición del crecimiento (Figura 12 A), del 80% en la línea de carcinoma indiferenciado de pulmón COR-L23 (Figura 12 B) y del 97%% en la línea de carcinoma de estómago HGC-23 (Figura 12 C).

Tabla 6: Líneas cancerosas humanas no tiroideas seleccionadas por su origen en cánceres similares al carcinoma anaplásico de tiroides

Línea	Órgano de origen	Tipo de cáncer y/o diagnóstico patológico	Paciente origen	Mutaciones conocidas	Referencia	Eficiencia de transfección (Turbofect)
PANC-1	Páncreas (Pancreas head)	Undifferentiated/Anaplastic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	Varon caucásico 56 años	CDKN2A deletion, homozygous KRAS G12D, heterozygous TP53 R273H, homozygous	Lieber M.M., et al, & Todaro G.J. Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. Int. J. Cancer 15:741-747(1975)	74%
COR-L23	Pulmón (Pleural Effusion)	Undifferentiated (Large Cell)/Anaplastic Lung Carcinoma (NSCLC, Giant Cell Anaplastic Lung Carcinoma)	Varon caucásico 62 años	KRAS G12V, homozygous	Baillie-Johnson H., et al, & Bleehen N.M. Establishment and characterisation of cell lines from patients with lung cancer (predominantly small cell carcinoma). Br. J. Cancer 52:495-504(1985)	73%
HGC-27	Estómago (metastatic lymph node from a patient with a gastric cancer)	Undifferentiated Gastric Carcinoma	Género y edad desconocidas (sospecha mujer), asiático	ATR G2316fs*9, heterozygous PIK3CA E542L, heterozygous TP53 W153fs*28	Akagi T., Kimoto T. Human cell line (HGC-27) derived from the metastatic lymph node of gastric cancer. Acta Med. Okayama 30:215-219 (1976)	80%

REIVINDICACIONES

1- Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos antisentido complementaria a una región diana del ARNm PIAS2β, en el que la unión del ácido nucleico a su secuencia diana produce la inhibición de la expresión del ARNm PIAS2β.

2- El ácido nucleico según la reivindicación 1 en el que la secuencia diana se localiza en el exón 14 del ARNm PIAS2β.

3- El ácido nucleico según la reivindicación 1 en el que la secuencia diana se selecciona del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO. 1-5 y secuencias funcionalmente equivalentes.

4- El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en un ácido nucleico bicatenario de interferencia de ARN, un oligonucleótido antisentido, un gapmero, un APN, un LNA, un INA, un HNA, un morfolino, una ribozima y un aptámero.

5- El ácido nucleico según la reivindicación 4 en el que el ácido nucleico es un ácido nucleico bicatenario de interferencia de ARN seleccionado del grupo que consiste en ARN interferente pequeño (ARNip), ARN horquillado corto (ARNhc) y un microARN (miARN).

6- El ácido nucleico según la reivindicación 5 en el que el ácido nucleico es un ARN interferente pequeño.

7- El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que la secuencia de nucleótidos antisentido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6-10 y secuencias funcionalmente equivalentes.

8- El ácido nucleico según la reivindicación 7 el que la secuencia de nucleótido antisentido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO.7 y secuencias funcionalmente equivalentes.

9- El ácido nucleico según la reivindicación 8 en el que la secuencia de nucleótidos antisentido es SEQ ID NO. 6 o una secuencia funcionalmente equivalente.

10- El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el ácido nucleico es bicatenario de interferencia de ARN y comprende además una secuencia de nucleótidos sentido, complementaria a la secuencia antisentido.

11- El ácido nucleico según la reivindicación 10 en la que la secuencia de nucleótidos antisentido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6-10 y secuencias

funcionalmente equivalentes, y la secuencia sentido del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11-15 y secuencias funcionalmente equivalentes.

12- El ácido nucleico según la reivindicación 11 en el que la secuencia de nucleótidos antisentido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 y secuencias funcionalmente equivalentes, y la secuencia de nucleótidos sentido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO.11, SEQ ID NO. 12 y secuencias funcionalmente equivalentes.

13- El ácido nucleico según la reivindicación 12 en el que la secuencia de nucleótidos antisentido es SEQ ID NO. 6 o una secuencia funcionalmente equivalente y la secuencia de nucleótidos sentido en SEQ ID NO. 11 o una secuencia funcionalmente equivalente.

14- El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que la secuencia de nucleótidos antisentido comprende una secuencia de al menos dos uracilos en el extremo 3'.

15- El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la secuencia de nucleótidos sentido comprende una secuencia de al menos dos uracilos en el extremo 3'.

16- El ácido nucleico según las reivindicaciones 13, en el que las secuencias antisentido y sentido comprenden una secuencia de al menos dos uracilos en sus extremos 3'.

17- Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia antisentido del ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

18- El vector según la reivindicación 17 que comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia sentido del ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-16.

19- Una célula huésped que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o el vector según cualquiera de las reivindicaciones 17-18.

20- Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o el vector según cualquiera de las reivindicaciones 17-18, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

21- Un inhibidor de la proteína PIAS2β para su uso en el tratamiento del cáncer de un paciente.

22- El inhibidor para su uso según la reivindicación 21 en el que el cáncer es un carcinoma anaplásico o un cáncer que presenta un elevado grado de aneuploidía.

23- El inhibidor para su uso según la reivindicación 22 en el que el carcinoma anaplásico se selecciona del grupo formado por adenocarcinoma ductal pancreático anaplásico o no diferenciado, carcinoma de pulmón anaplásico de células grandes o carcinoma de pulmón anaplásico de células gigantes y carcinoma gástrico no diferenciado

24- El inhibidor para su uso según la reivindicación 21 o 22 en el que el cáncer o el carcinoma anaplásico selecciona del grupo que consiste en carcinoma anaplásico de tiroides, carcinoma pobremente diferenciado de tiroides, o carcinoma indiferenciado recurrente de tiroides.

25- El inhibidor para su uso de la reivindicación 24 en el que el cáncer es un carcinoma anaplásico de tiroides.

26- El inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 21-25 en el que el inhibidor es un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, un vector según cualquiera de las reivindicaciones 17-18 o combinaciones de los mismos.

27- El inhibidor para su uso según la reivindicación 26 en el que el inhibidor es un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o combinaciones de los mismos.

28- El inhibidor para su uso según la reivindicaciones 27 en la que el inhibidor es el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 12-16, o combinaciones de los mismos.

29- El inhibidor para su uso según las reivindicaciones 28 en la que el inhibidor es el ácido nucleico de la reivindicación 16.

30- La composición farmacéutica según la reivindicación 20 para su uso en el tratamiento del cáncer de un paciente, seleccionado del grupo que consiste en carcinoma anaplásico de tiroides, carcinoma pobremente diferenciado de tiroides, o carcinoma indiferenciado recurrente de tiroides.

31- El inhibidor para su uso según las reivindicaciones 21-29 o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 30, en el que el inhibidor o la composición farmacéutica se administra al menos dos veces por semana al paciente.

32- El inhibidor para su uso según las reivindicaciones 21-29 o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 30, en el que el inhibidor o la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa al paciente.

33- Un método de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar de forma diferencial la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β o de la isoforma α del gen PIAS2 en una muestra, dicho proceso comprende:

(a) proporcionar al ensayo de PCR que contiene dicha muestra un oligonucleótido marcado que contenga una secuencia complementaria a una región del ácido nucleico diana, en donde dicho oligonucleótido marcado se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana uniéndose por los cebadores del paso (b) y en donde dicho oligonucleótido marcado tiene la secuencia SEQ ID NO:87 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o

SEQ ID NO:88 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2;

(b) proporcionar una pareja de cebadores, en donde el primer cebador contenga una secuencia complementaria a una región de una cadena de la secuencia de ácido nucleico diana e inicie la síntesis de un producto de extensión y un segundo cebador que contenga una secuencia complementaria a la otra cadena de la secuencia de ácido nucleico diana o complementaria a una región en el producto de extensión del primer cebador e inicie la síntesis de una cadena complementaría de DNA; y en donde cada cebador se selecciona para que se hibride con su molde complementario corriente arriba de cualquier oligonucleótido marcado hibridado con la misma cadena de ácido nucleico en donde la pareja de cebadores está formada por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:90 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:91 y SEQ ID NO:92 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2,

(c) amplificar la secuencia de ácido nucleico diana empleando una polimerasa de ácido nucleico con actividad nucleasa 5' a 3' como agente polimerizante dependiente de molde bajo condiciones permisivas para los pasos de ciclación de la PCR de (i) hibridación de los cebadores y el oligonucleótido marcado con una secuencia de ácido nucleico molde contenida dentro de la secuencia diana, y (ii) extensión del cebador en donde dicha polimerasa de ácido nucleico sintetiza un producto de extensión de cebador mientras la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa de ácido nucleico libera simultáneamente fragmentos marcados de las dobles cadenas hibridadas que comprenden oligonucleótidos marcados y sus complementarias secuencias molde de ácido nucleico, creando de este modo fragmentos marcados detectables y

(d) detectar y/o medir la señal generada por la hidrólisis del oligonucleótido marcado para determinar la presencia o ausencia de la secuencia diana en la muestra.

34- El método de la reivindicación 33 en donde el oligonucleótido marcado comprende un par de marcadores generadores de señal interactivos posicionados adecuadamente en el oligonucleótido para apantallar la generación de señal detectable, dichos marcadores están separados por un lugar dentro del oligonucleótido susceptible a escisión por nucleasa, de este modo permite, durante la extensión de cebadores, la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa de ácido nucleico para separar el primer marcador generador de

señal interactivo del segundo marcador generador de señal interactivo por escisión en el lugar susceptible, produciendo así una señal detectable.

35- El método de la reivindicación 34 en donde dicho primer marcador es un sustrato quimioluminiscente y dicho segundo sustrato es un fluoróforo que interacciona con el mismo.

36- Un kit para la detección diferencial de la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β o de la isoforma α del gen PIAS2 en una muestra que comprende:

(a) al menos un oligonucleótido marcado que contiene una secuencia complementaria a una región del ácido nucleico diana en donde dicho oligonucleótido marcado tiene la secuencia SEQ ID NO:87 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o SEQ ID NO:88 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2 y en donde el extremo 3' del oligonucleótido marcado esté bloqueado para prevenir la extensión por una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad 5' a 3 y el oligonucleótido marcado contiene marcadores primeros y segundos estando el primer marcador separado del segundo por un sitio susceptible de escisión por una nucleasa y en el que los marcadores del oligonucleótido marcado constituyen un par de marcadores generadores de señales interactivas situados sobre el oligonucleótido para apantallar la generación de señal detectable y

(b) al menos una pareja de cebadores, formada por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:90 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma α del gen PIAS2 o por los cebadores de secuencia SEQ ID NO:91 y SEQ ID NO:92 cuando se desea detectar la secuencia de ácido nucleico de la isoforma β del gen PIAS2.

37- El kit de la reivindicación 36 que además comprende una polimerasa de ácido nucleico con actividad nucleasa 5' a 3'.

38- El kit de la reivindicación 37 en donde dicha polimerasa de ácido nucleico es una enzima termoestable, preferiblemente una DNA Polimerasa de especies de *Thermus*.

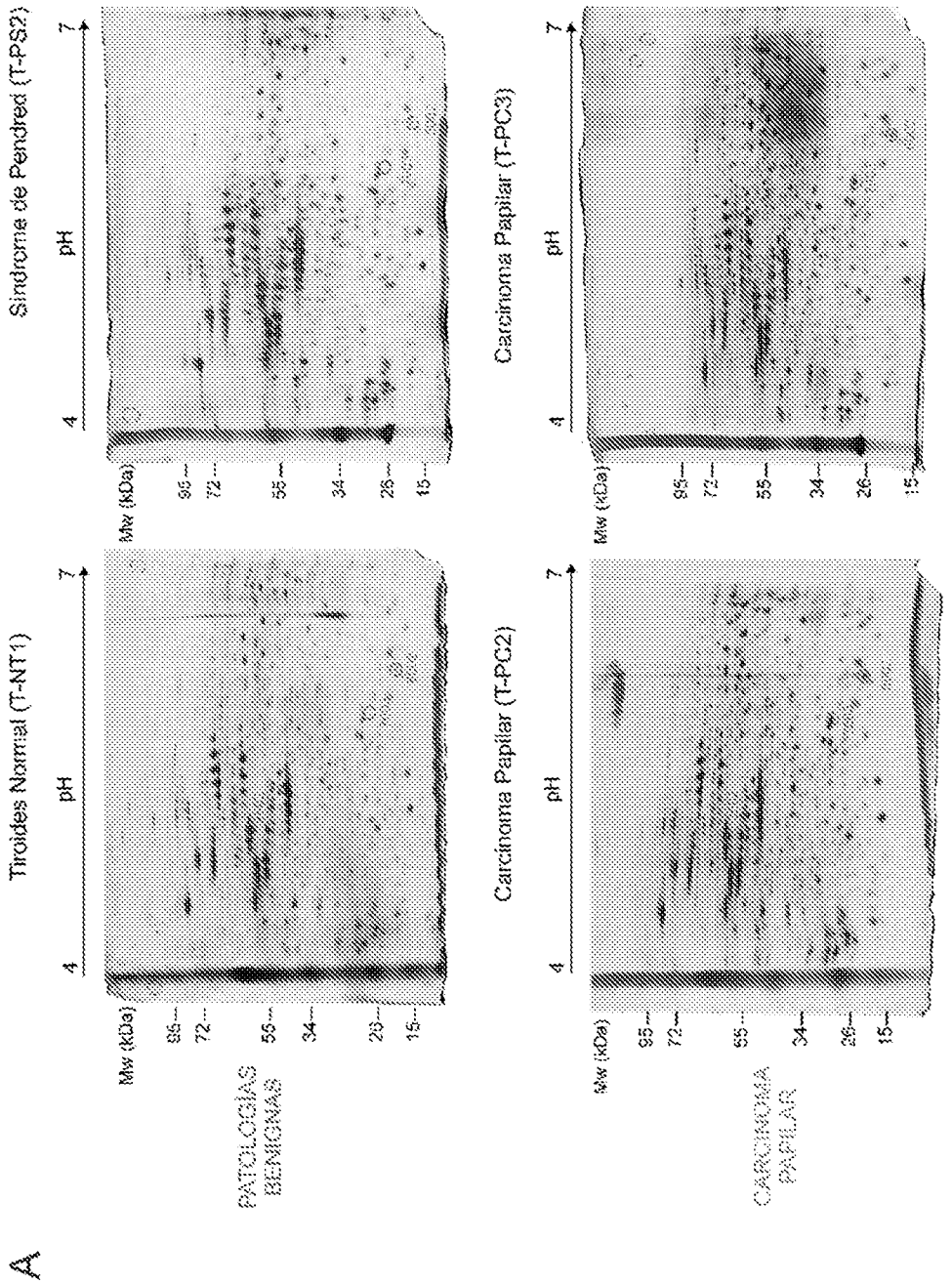

A
Tiroides Normal (T-NT1)
Síndrome de Pendred (T-PS2)
Carcinoma Papilar (T-PC2)
Carcinoma Papilar (T-PC3)
pH
4
7
Mw (kDa)
95
72
55
34
26
15
PATOLOGÍAS BENIGNAS
CARCINOMA PAPILAR

Fig. 1

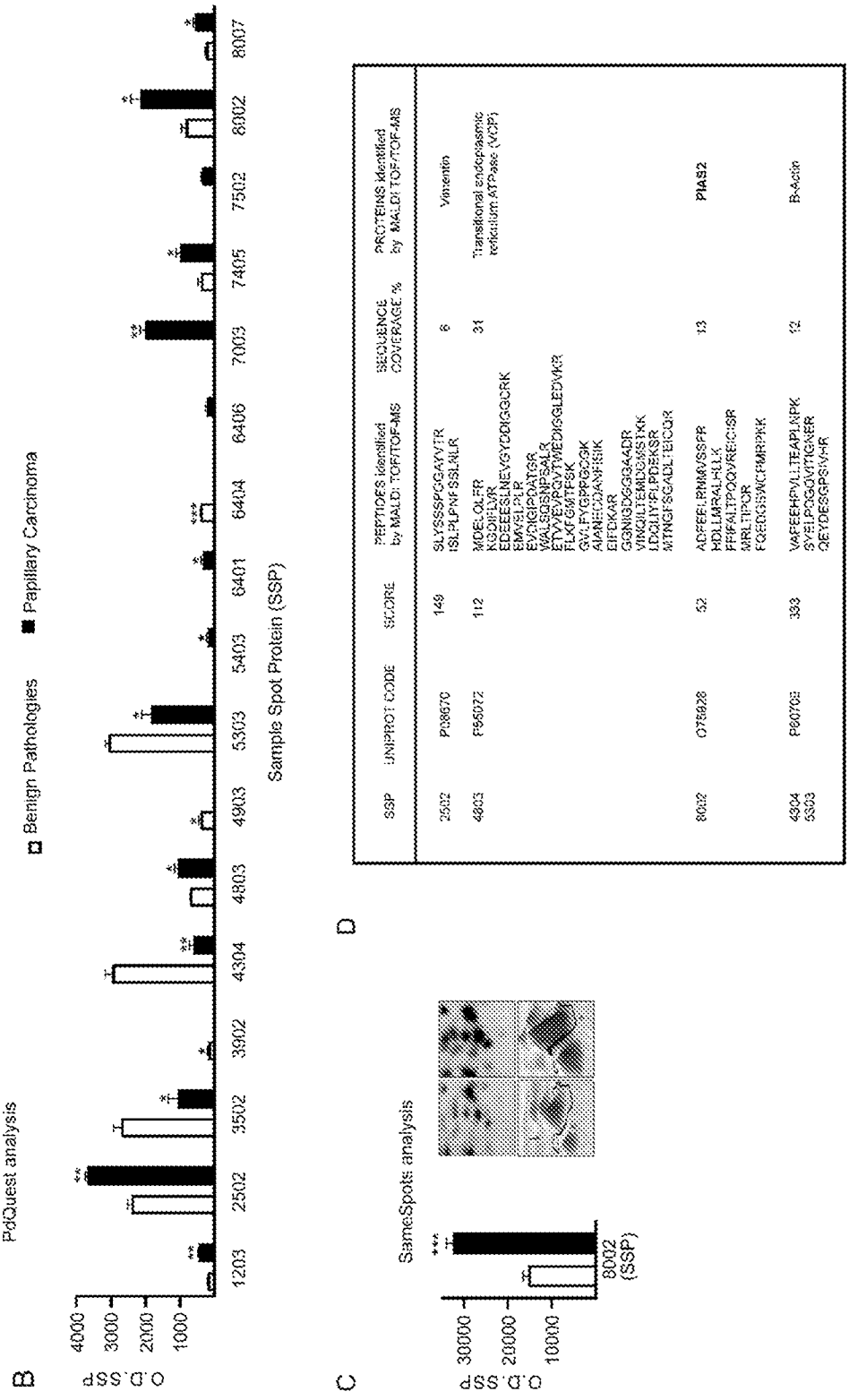

B
PdQuest analysis
Benign Pathologies
Papillary Carcinoma
O.D.SSP
4000
3000
2000
1000
1203
2502
3502
3902
4304
4803
4903
5303
5403
6401
6404
6406
7003
7405
7502
8002
8007
Sample Spot Protein (SSP)
C
SameSpots analysis
O.D.SSP
30000
20000
10000
8002
(SSP)
D
SSP
UNIPROT CODE
SCORE
PEPTIDES identified by MALDI TOF/TOF-MS
SEQUENCE COVERAGE %
PROTEINS identified by MALDI TOF/TOF-MS
2502
P08670
149
SLYSSSPGGAVYTR
ISLPLPNFSSLNLR
6
Vimentin
4803
P55072
112
MDELQLFR
KSDIELNR
EDEEESLNEVSYDDKGGLRK
EMKELPLR
EVDKGIPDATGR
VALSGSNPSALR
ETVYEVPGVTVMEDHGGLEDVKR
FLKFGMTPSK
GVLFYGPPGCGK
AIANECQANFISK
EIFDKAR
GGNIGDGGGAADR
VINQLTEMDGMSTKK
LDQLYKLPDEKSR
MTNGFSGADLTETCQR
31
Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP)
8002
O75828
52
ADFEELRMMVSSFR
HDLLMRALHLLK
FFPKLTPDQQVRECHSR
MRLTTPCR
FQEDGSWCFMMRPPK
13
PIAS2
4304
5303
P60709
333
VAPEEHPVLLTEAPLNPK
SVELPQGQVITIGNER
QEYDESGPSIVHR
12
B-Actin

Fig. 1 (cont.)

Gene ENSEMBL ID	RNA Name ENSEMBL	Transcript ID ENSEMBL	bp ENSEMBL	Protein ENSEMBL	Biotype ENSEMBL	Gene NCBI ID	RNA Refseq NCBI	RNA Name NCBI	Protein Refseq NCBI	Protein Name NCBI
							NM_001324046	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 4, mRNA	NP_001310975	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 4
							NM_001324047	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 5, mRNA	NP_001310976	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
							NM_001324048	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 6, mRNA	NP_001310977	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
							NM_001324049	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 7, mRNA	NP_001310978	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
							NM_001354034	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 19, mRNA	NP_001340963	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 10
							NM_001354035	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 20, mRNA	NP_001340964	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
	PIAS2-204	ENST00000585916.5	11075	621aa	Protein coding		NM_001354036	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 21, mRNA	NP_001340965	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
							NM_001354038	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 27, mRNA	NP_001340967	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
							NM_001354039	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 28, mRNA	NP_001340968	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
							NM_004671	**Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant beta, mRNA**	**NP_004662**	**E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform beta**
							NR_148700	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 24, non-coding RNA		
							NR_148701	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 25, non-coding RNA		
							NR_148703	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 29, non-coding RNA		
							NM_001324051	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 8, mRNA	NP_001310980	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
							NM_001324052	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 9, mRNA	NP_001310981	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
							NM_001324053	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 10, mRNA	NP_001310982	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
							NM_001324054	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 11, mRNA	NP_001310983	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
	PIAS2-201	ENST00000324794.11	4543	572aa	Protein coding		NM_001324058	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 15, mRNA	NP_001310987	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 9
							NM_001354033	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 18, mRNA	NP_001340962	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
							NM_172206	**Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant alpha, mRNA**	**NP_775288**	**E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform alpha**
							NR_148699	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 22, non-coding RNA		
ENSG00000078043						9063	NM_001324055	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 12, mRNA	NP_001310984	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
							NM_001324057	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 13, mRNA	NP_001310986	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
	PIAS2-215	ENST00000592212.5	2790	536aa	Protein coding		NM_001324059	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 14, mRNA	NP_001310988	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
							NM_001324060	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 3, mRNA	NP_001310989	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform NY
							NM_001354037	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 23	NP_001340966	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
	PIAS2-203	ENST00000545673.5	1590	282aa	Protein coding		NR_136685	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 17, non-coding RNA		
	PIAS2-210	ENST00000589917.1	561	122aa	Protein coding					
	PIAS2-216	ENST00000592221.5	502	89aa	Protein coding					
	PIAS2-207	ENST00000586953.1	497	88aa	Protein coding					
	PIAS2-208	ENST00000587810.1	447	95aa	Protein coding					
	PIAS2-202	ENST00000398654.7	2043	182aa	Nonsense mediated decay		NR_136684	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 16, non-coding RNA		
							NR_148702	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 26, non-coding RNA		
	PIAS2-212	ENST00000590944.1	404	No protein	Processed transcript					
	PIAS2-205	ENST00000586170.1	332	No protein	Processed transcript					
	PIAS2-211	ENST00000590127.5	1838	No protein	Retained intron					
	PIAS2-214	ENST00000592011.5	1394	No protein	Retained intron					
	PIAS2-209	ENST00000589819.1	589	No protein	Retained intron					
	PIAS2-206	ENST00000586634.1	585	No protein	Retained intron					
	PIAS2-213	ENST00000591865.1	515	No protein	Retained intron					

Fig. 2

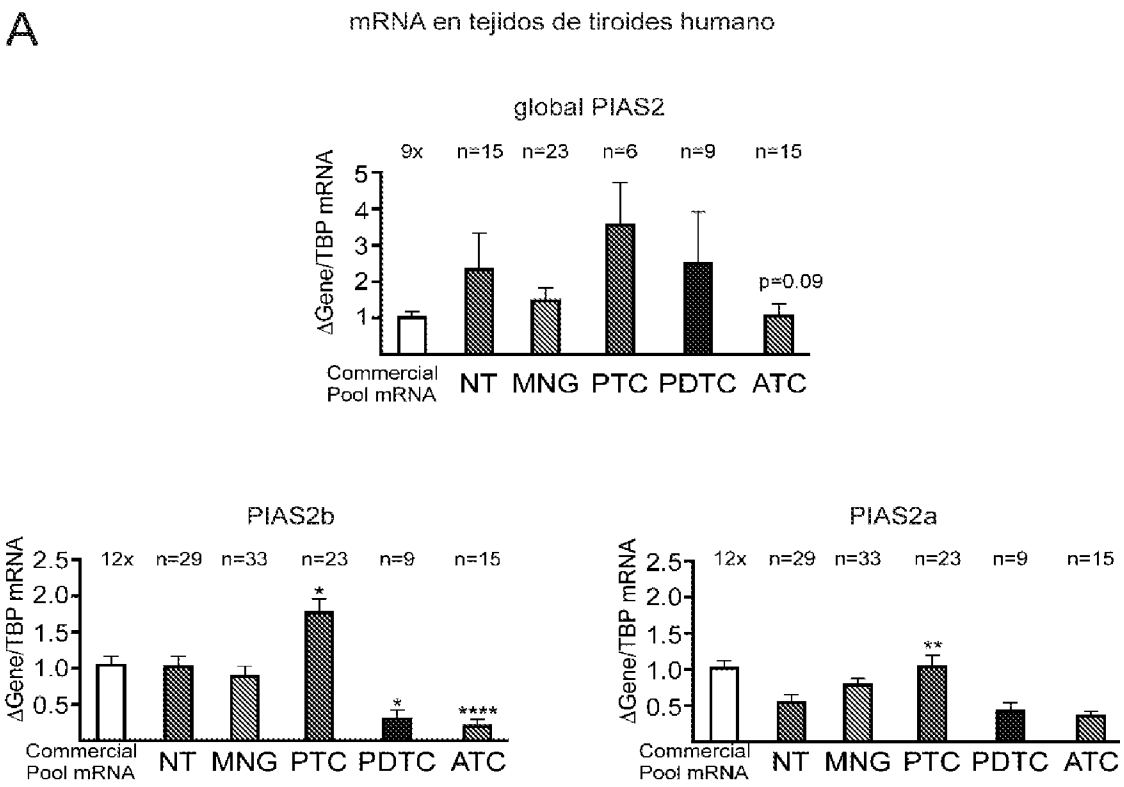

A
mRNA en tejidos de tiroides humano
global PIAS2
9x n=15 n=23 n=6 n=9 n=15
ΔGene/TBP mRNA
p=0.09
Commercial Pool mRNA
NT MNG PTC PDTC ATC
PIAS2b
12x n=29 n=33 n=23 n=9 n=15
PIAS2a
B
mRNA en parejas de tejidos del mismo paciente
NT PTC
PIAS2b
PIAS2a
9/18 16/20 19/21 22/25 23/27 23/28 24/29 31/33

Fig. 3

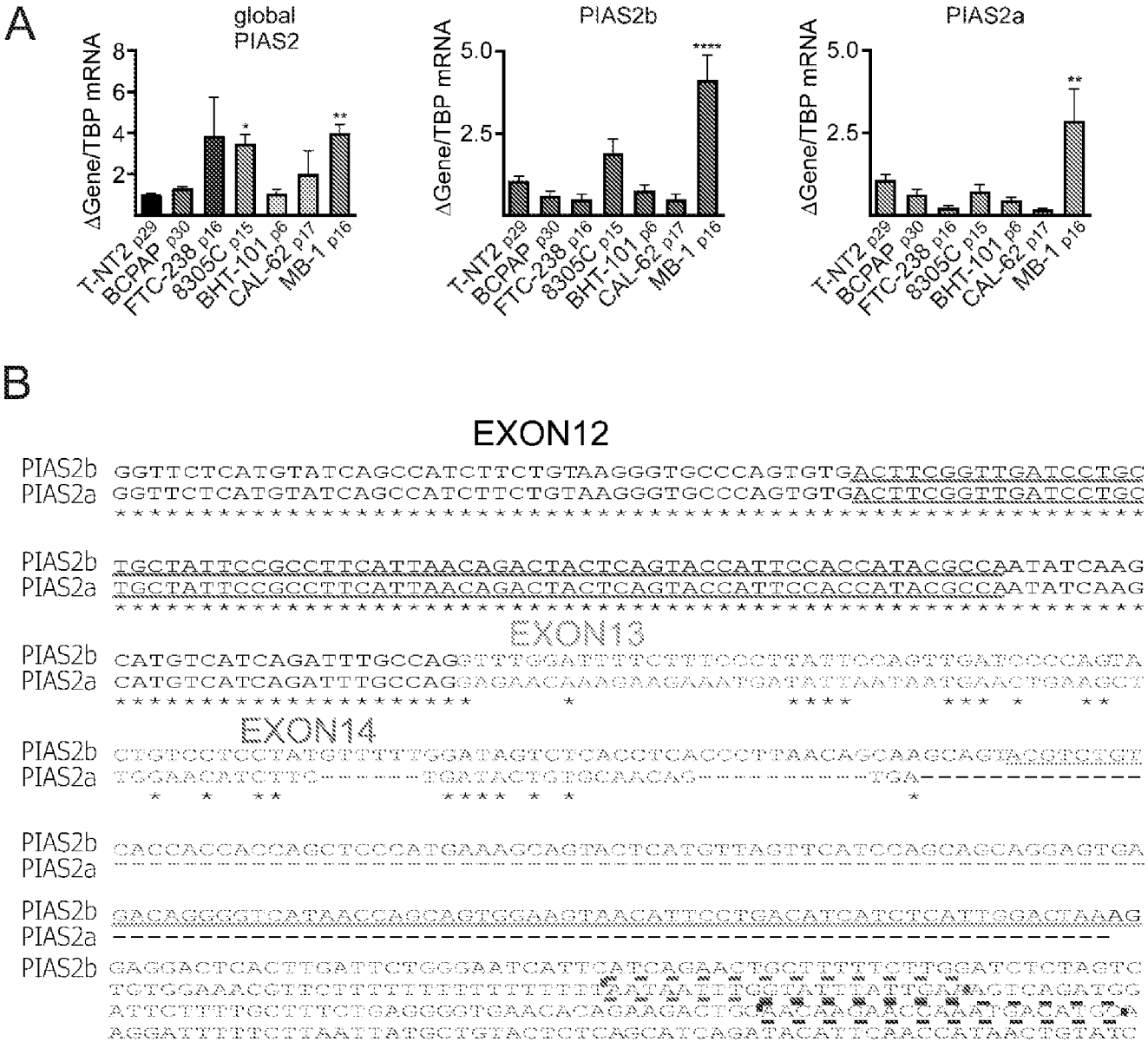
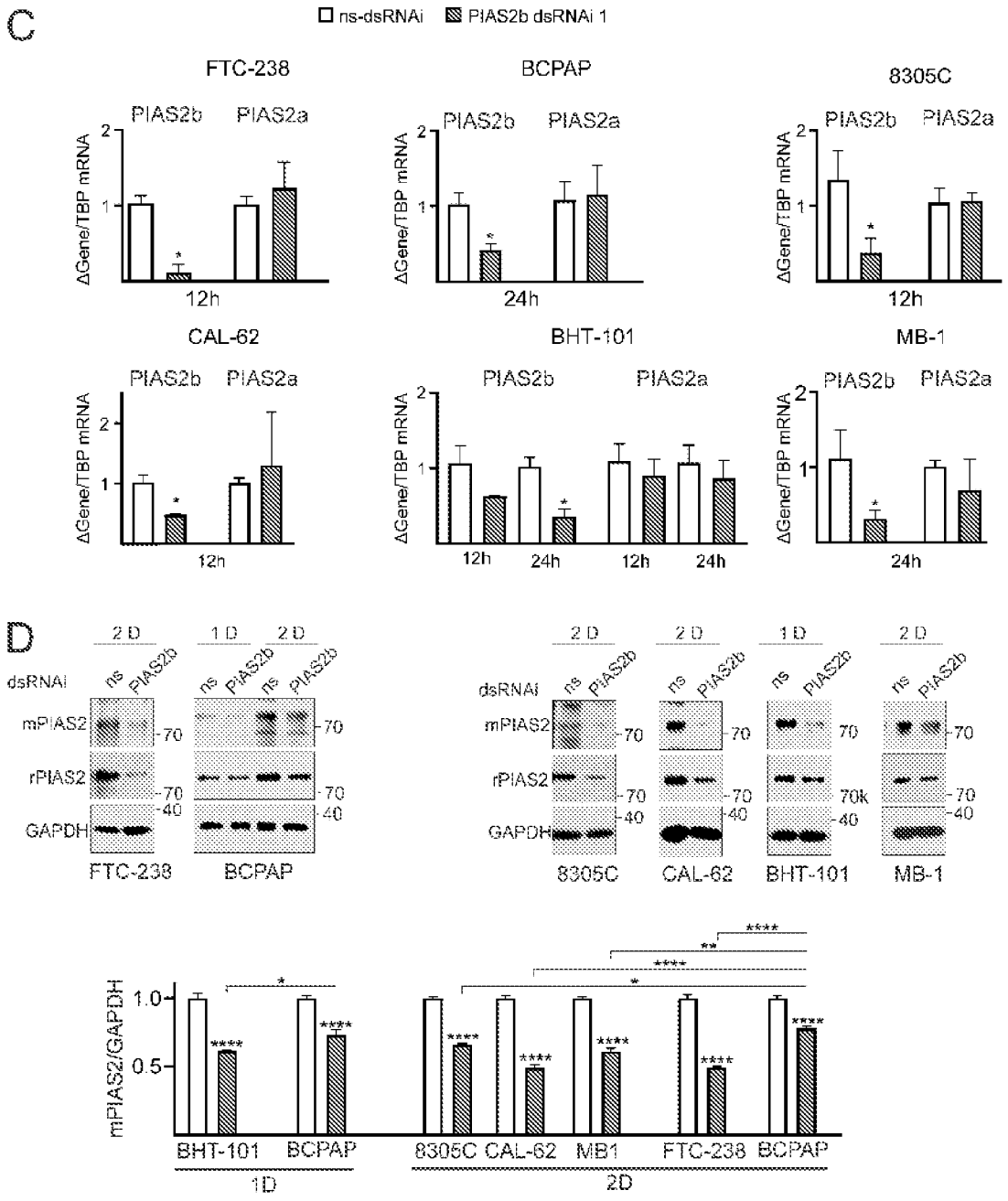

A
global PIAS2
PIAS2b
PIAS2a
ΔGene/TBP mRNA
T-NT2 p29
BCPAP p30
FTC-238 p16
8305C p15
BHT-101 p6
CAL-62 p17
MB-1 p16
B
EXON12
EXON13
EXON14
PIAS2b
PIAS2a

Fig. 4


C
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1
FTC-238
BCPAP
8305C
CAL-62
BHT-101
MB-1
PIAS2b
PIAS2a
ΔGene/TBP mRNA
12h
24h
D
2D
1D
dsRNAi
ns
PIAS2b
mPIAS2
rPIAS2
GAPDH
70
40
70k
FTC-238
BCPAP
8305C
CAL-62
BHT-101
MB-1
mPIAS2/GAPDH
1.0
0.5
****
**
*

4-

Fig. 4 (cont.)

6-

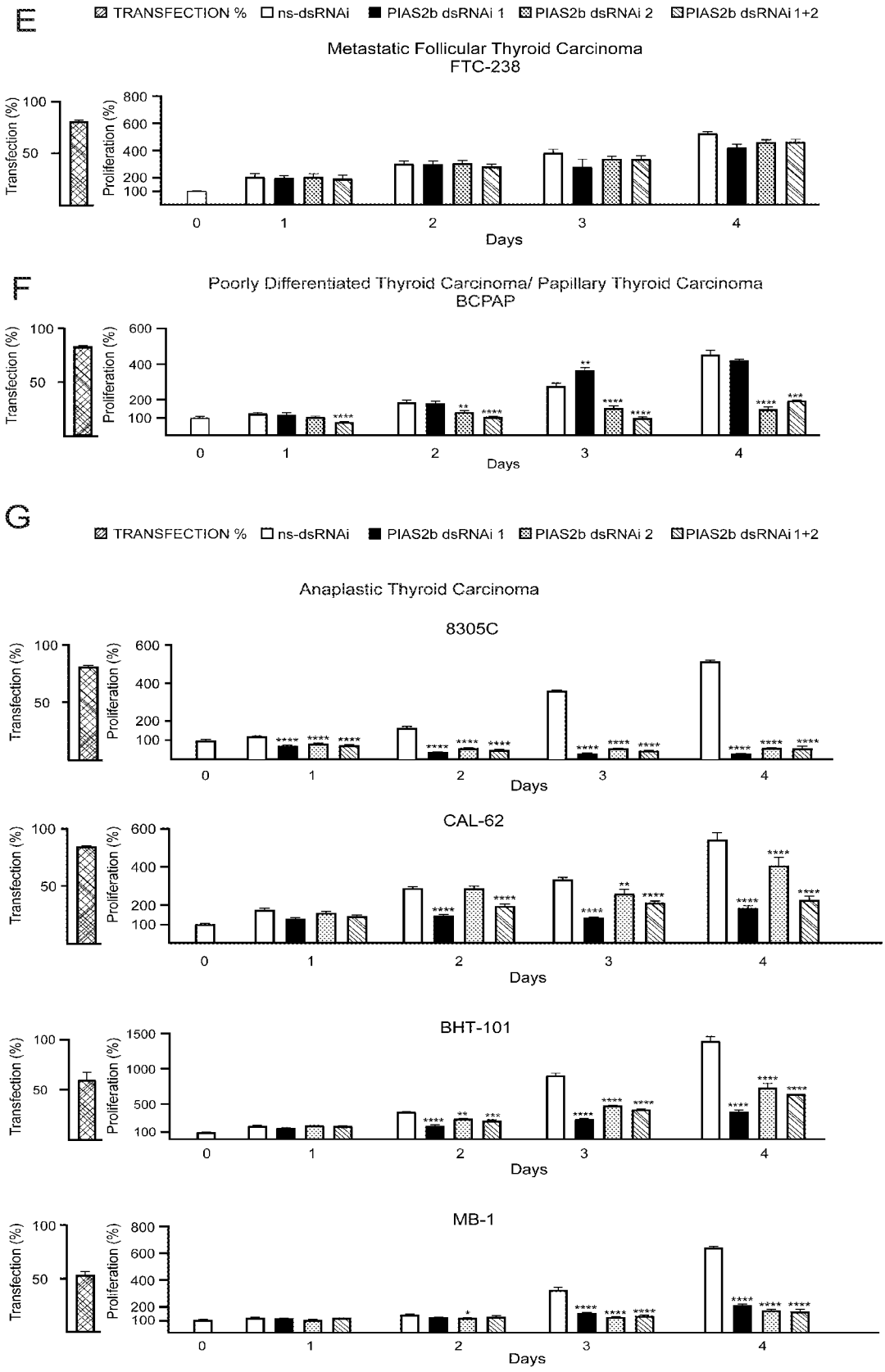
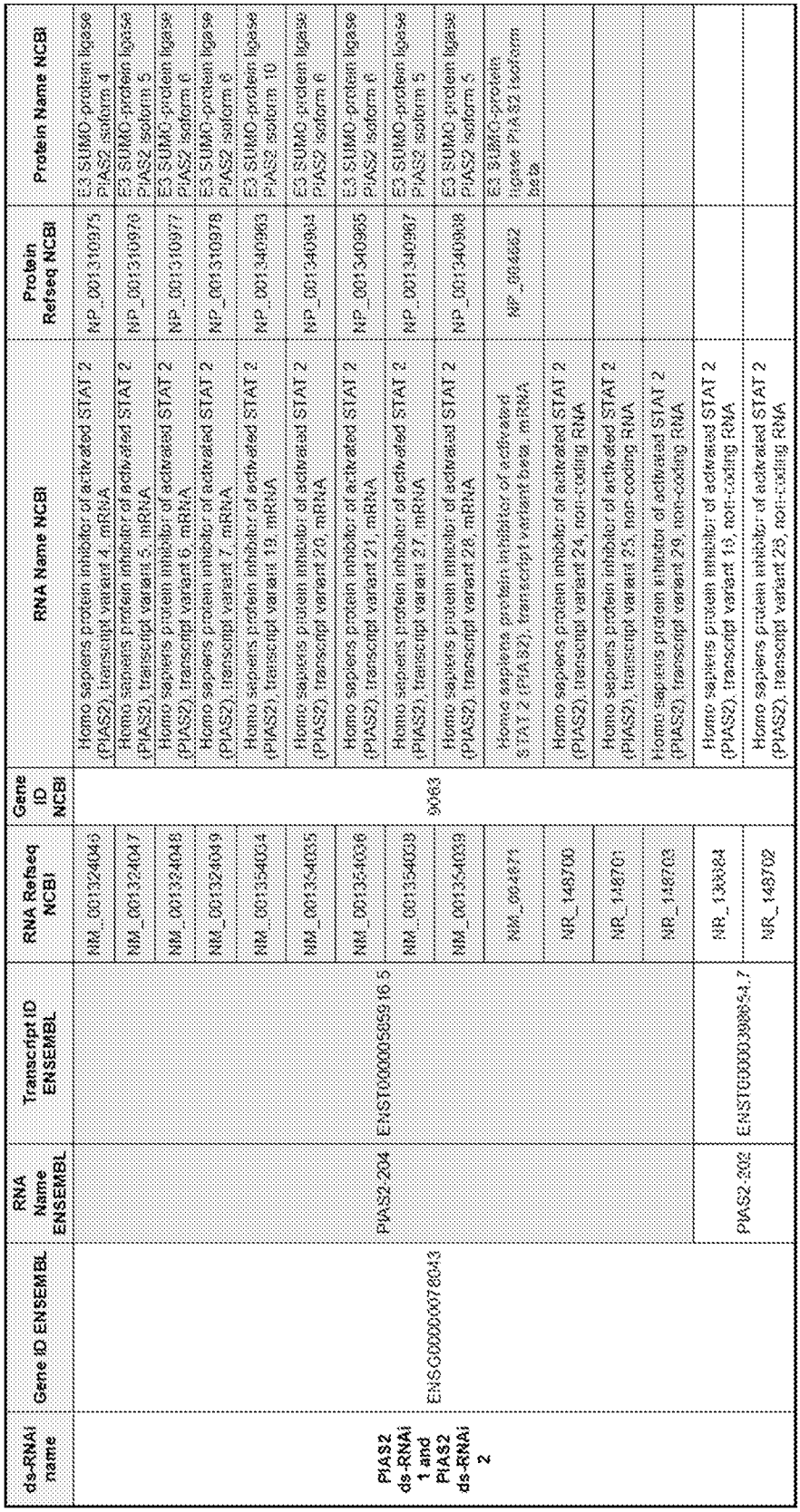

E
TRANSFECTION %
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1
PIAS2b dsRNAi 2
PIAS2b dsRNAi 1+2
Metastatic Follicular Thyroid Carcinoma
FTC-238
Transfection (%)
Proliferation (%)
Days
F
Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma/ Papillary Thyroid Carcinoma
BCPAP
G
Anaplastic Thyroid Carcinoma
8305C
CAL-62
BHT-101
MB-1

Fig. 4 (cont.)



ds-RNAi name	Gene ID ENSEMBL	RNA Name ENSEMBL	Transcript ID ENSEMBL	RNA Refseq NCBI	Gene ID NCBI	RNA Name NCBI	Protein Refseq NCBI	Protein Name NCBI
PIAS2 ds-RNAi 1 and PIAS2 ds-RNAi 2	ENSG00000078043	PIAS2-204	ENST00000358316.5	NM_001324045	9063	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 4, mRNA	NP_001310975	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 4
				NM_001324047		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 5, mRNA	NP_001310976	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
				NM_001324048		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 6, mRNA	NP_001310977	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
				NM_001324049		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 7, mRNA	NP_001310978	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
				NM_001354034		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 19, mRNA	NP_001340963	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 10
				NM_001354035		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 20, mRNA	NP_001340964	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
				NM_001354036		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 21, mRNA	NP_001340965	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
				NM_001354033		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 17, mRNA	NP_001340967	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
				NM_001354039		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 22, mRNA	NP_001340968	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
				NM_004671		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant beta, mRNA	NP_004662	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform beta
				NR_148700		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 24, non-coding RNA		
				NR_148701		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 25, non-coding RNA		
				NR_148703		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 28, non-coding RNA		
		PIAS2-202	ENST00000398854.7	NR_138284		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 16, non-coding RNA		
				NR_148702		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 26, non-coding RNA		

Fig. 5

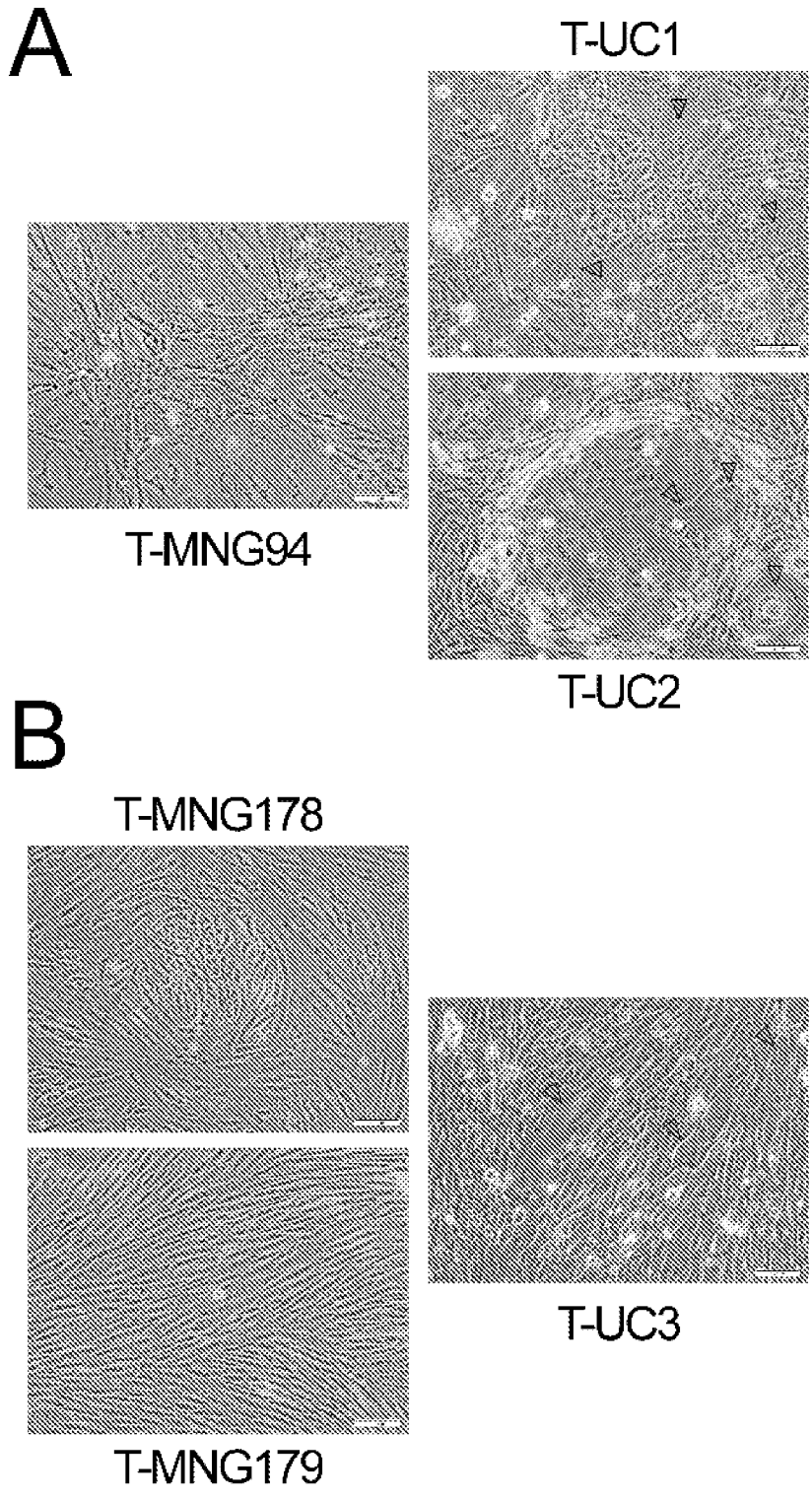


Fig. 6

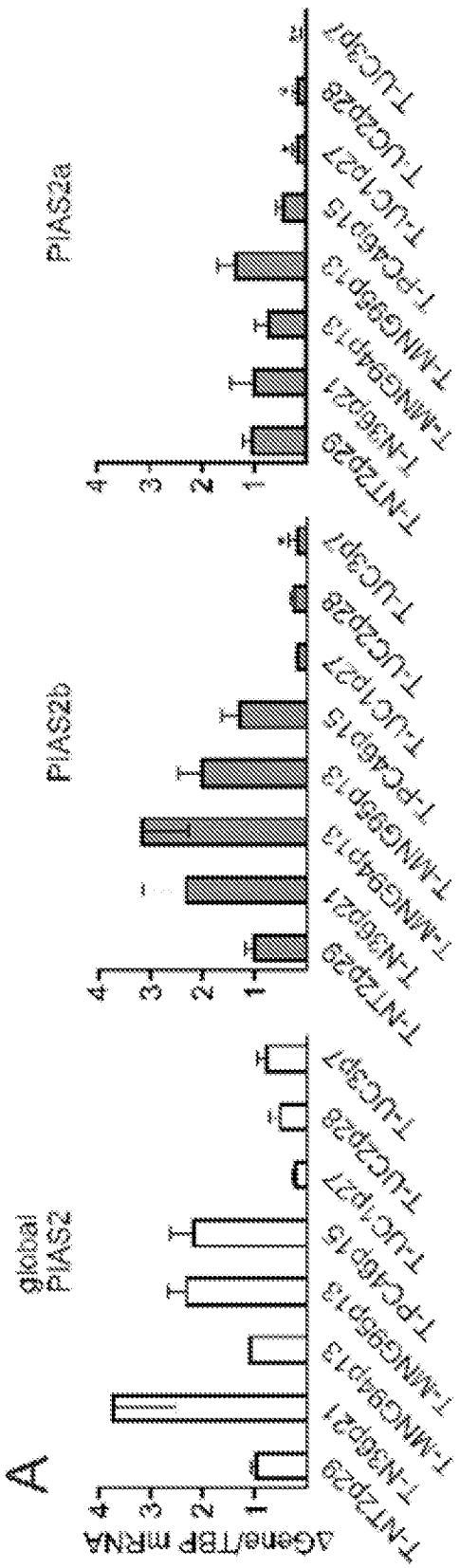

A
global PIAS2
PIAS2b
PIAS2a
ΔGene/TBP mRNA
T-NT2029
T-AN36921
T-MINC9421.13
T-MINC9922.13
T-PC4615
T-UC1927
T-UC2028
T-UC39?

Fig. 7

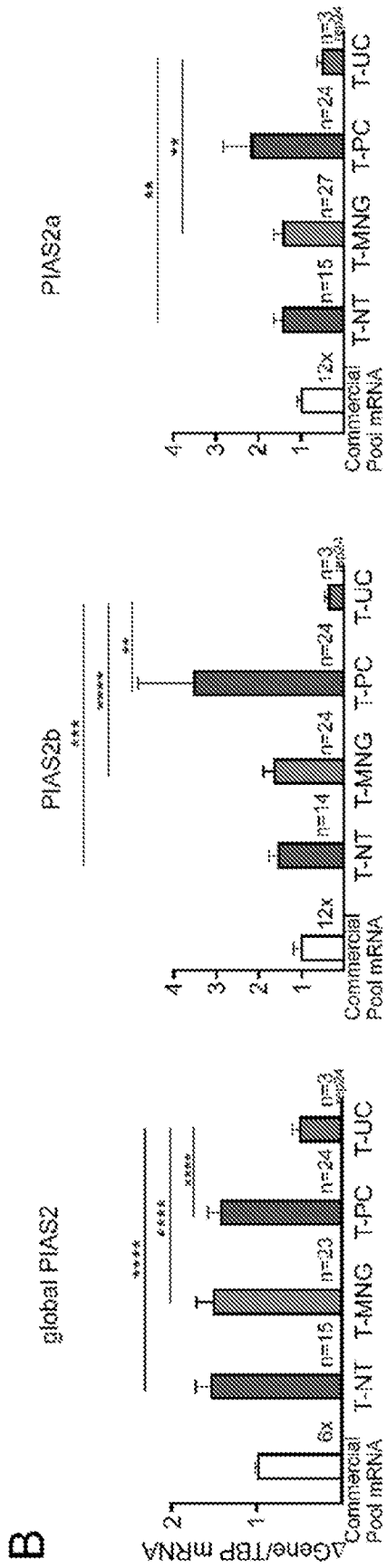

B
global PIAS2
PIAS2b
PIAS2a
ΔGene/TBP mRNA
Commercial Pool mRNA
12x
6x
T-NT
T-MNG
T-PC
T-UC
n=15
n=33
n=14
n=27
n=24
n=3
****
***
**

Fig. 7 (cont.)

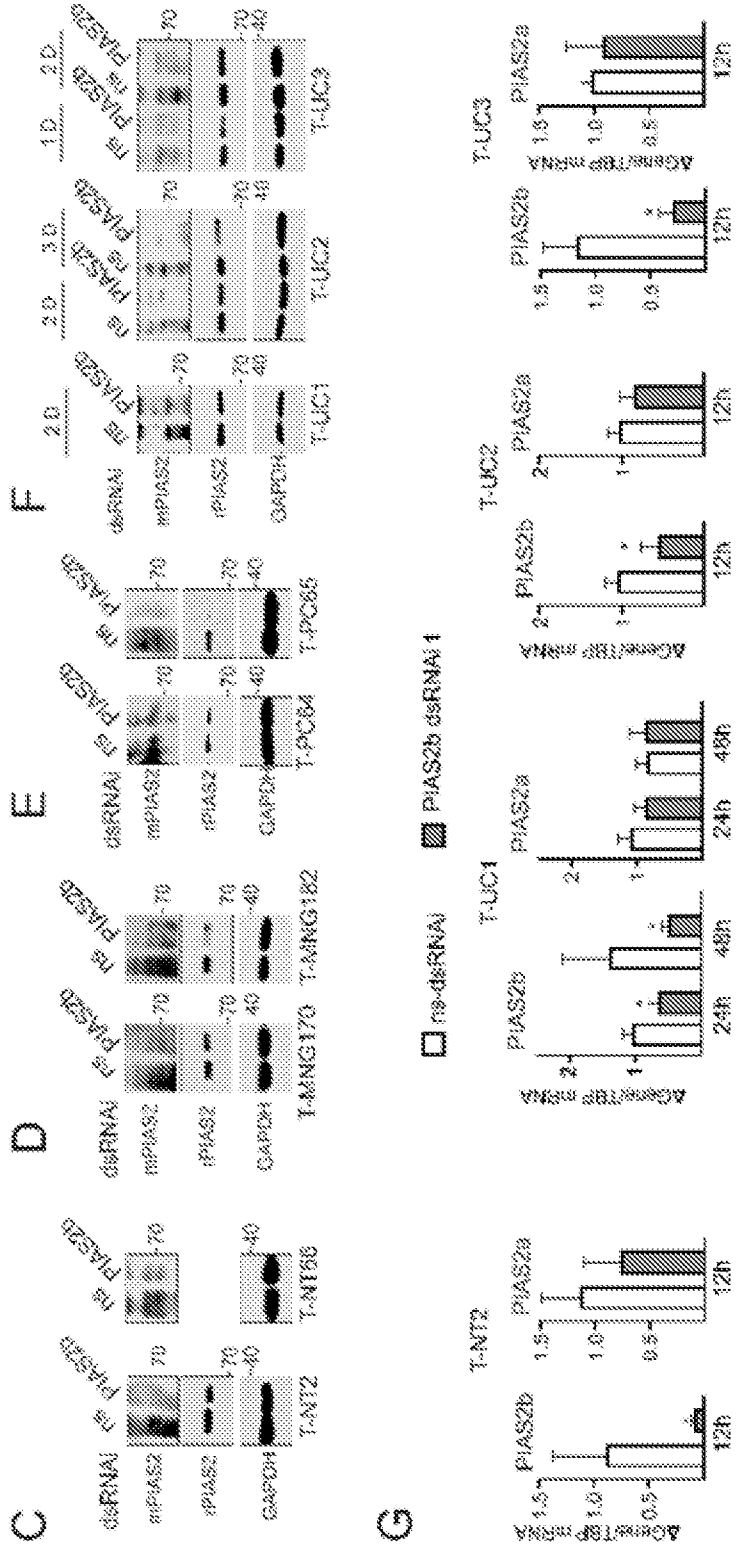

C
D
E
F
G
dsRNA
ns
PIAS2b
mPIAS2
rPIAS2
GAPDH
T-NT2
T-MT68
T-MNG170
T-MNG182
T-PC64
T-PC65
T-UC1
T-UC2
T-UC3
2.0
3.0
1.0
70
40
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1
PIAS2b
PIAS2a
ACTB mRNA
24h
48h
12h

Fig. 7 (cont.)

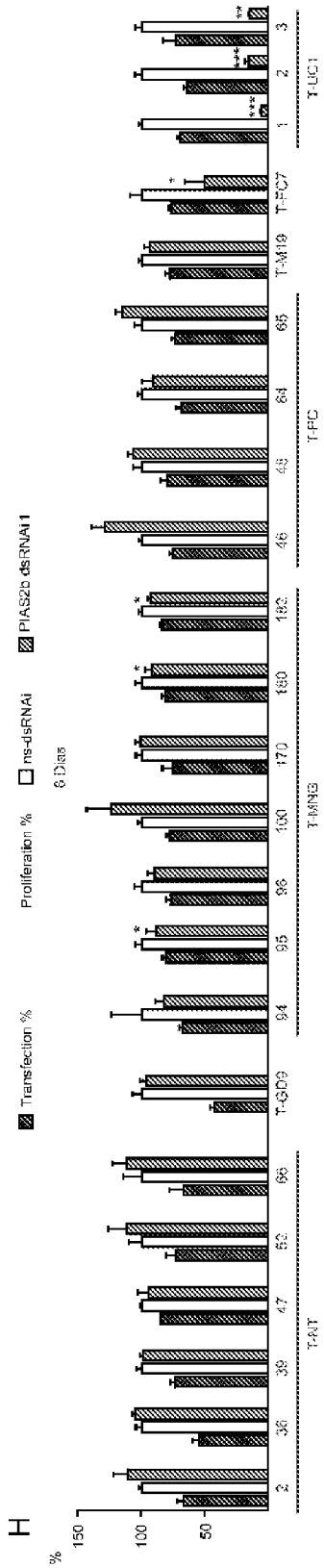

H
%
150
100
50
Transfection %
Proliferation %
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1
6 Días
T-AAT
T-GD9
T-MN9
T-PC
T-M19
T-PC7
T-UC1

Fig. 7 (cont.)

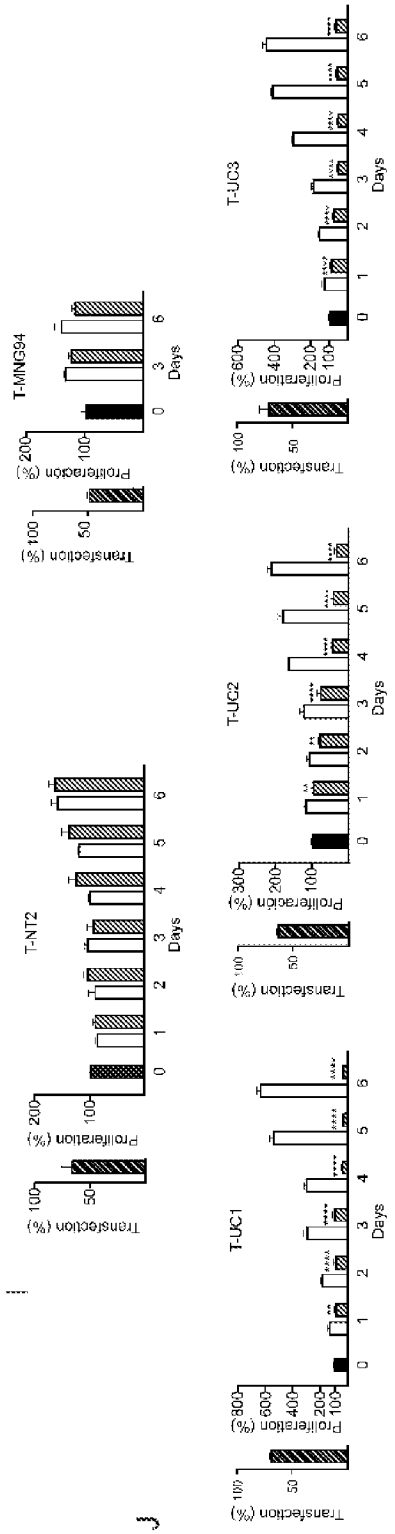

T-NT2
T-MNG94
T-UC1
T-UC2
T-UC3
Transfection (%)
Proliferation (%)
Days

Fig. 7 (cont.)

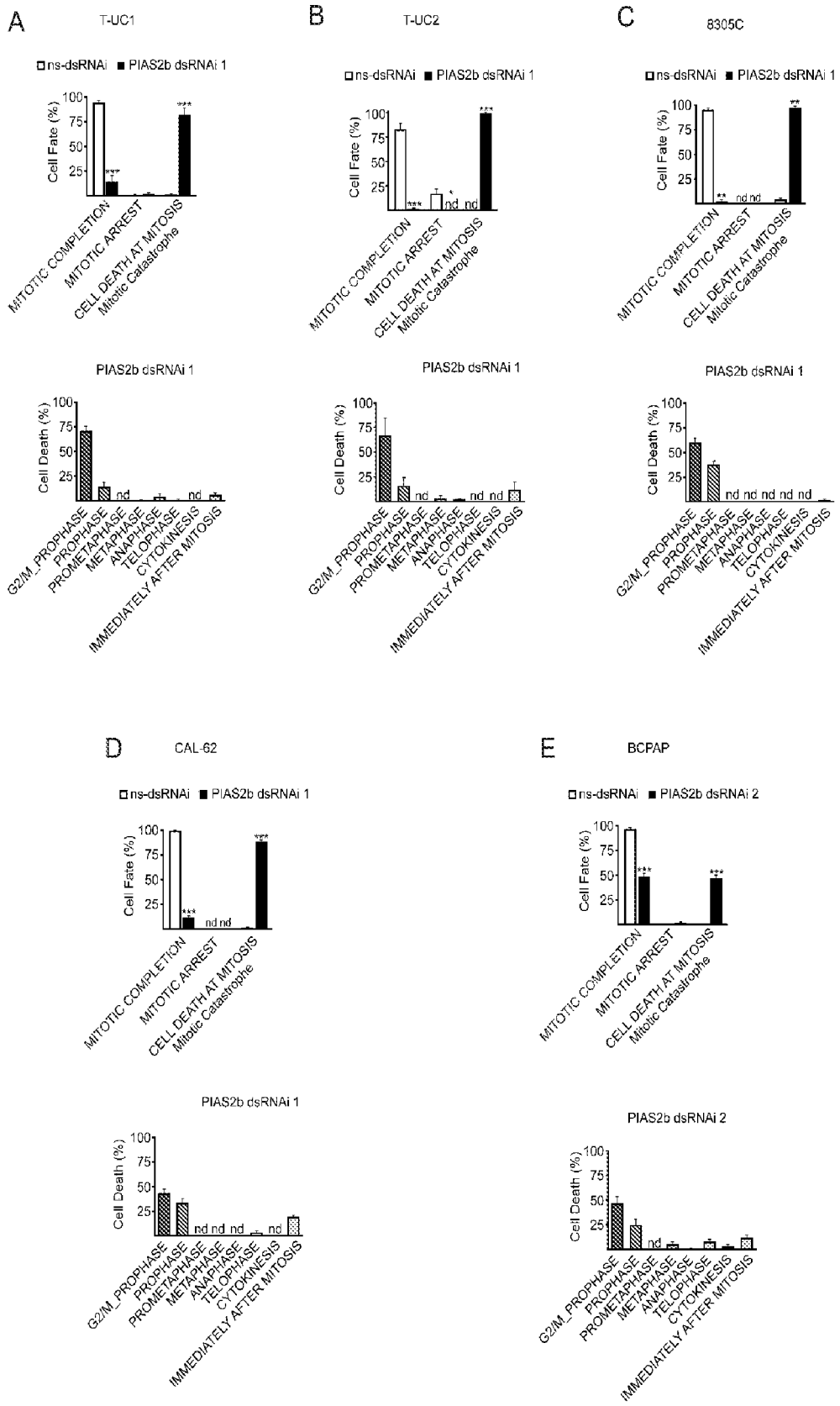

A
T-UC1
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1
Cell Fate (%)
MITOTIC COMPLETION
MITOTIC ARREST
CELL DEATH AT MITOSIS
Mitotic Catastrophe
PIAS2b dsRNAi 1
Cell Death (%)
G2/M_PROPHASE
PROPHASE
PROMETAPHASE
METAPHASE
ANAPHASE
TELOPHASE
CYTOKINESIS
IMMEDIATELY AFTER MITOSIS
B
T-UC2
C
8305C
D
CAL-62
E
BCPAP
PIAS2b dsRNAi 2

Figura 8

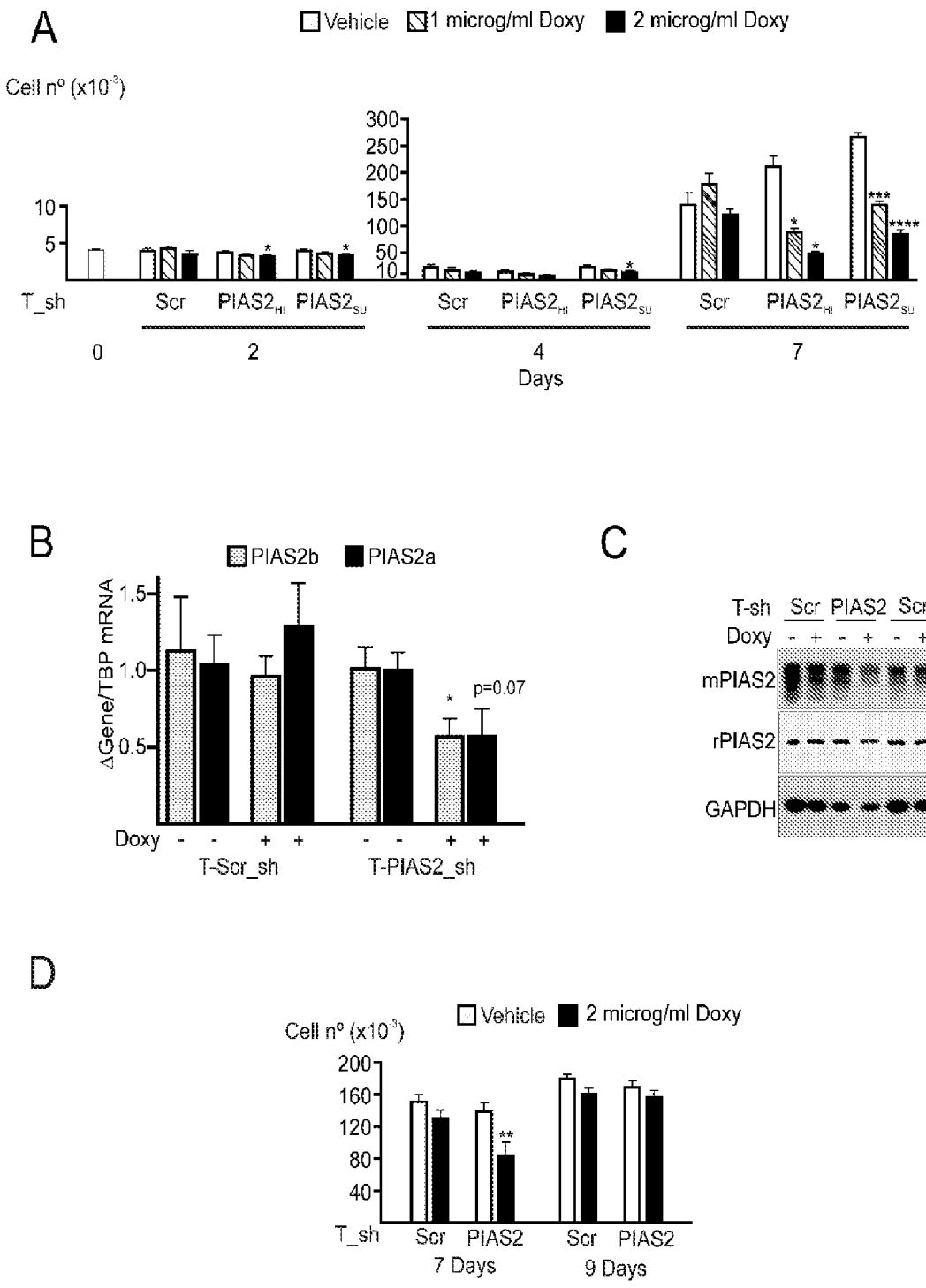

A
Vehicle
1 microg/ml Doxy
2 microg/ml Doxy
Cell nº (x10³)
300
250
200
150
100
50
10
10
5
T_sh
Scr
PIAS2HI
PIAS2SU
0
2
4
7
Days
B
PIAS2b
PIAS2a
ΔGene/TBP mRNA
1.5
1.0
0.5
p=0.07
Doxy
T-Scr_sh
T-PIAS2_sh
C
T-sh
Scr
PIAS2
Scr
Doxy
mPIAS2
rPIAS2
GAPDH
70
70
35
D
Vehicle
2 microg/ml Doxy
Cell nº (x10³)
200
160
120
80
40
T_sh
Scr
PIAS2
Scr
PIAS2
7 Days
9 Days

Fig. 9

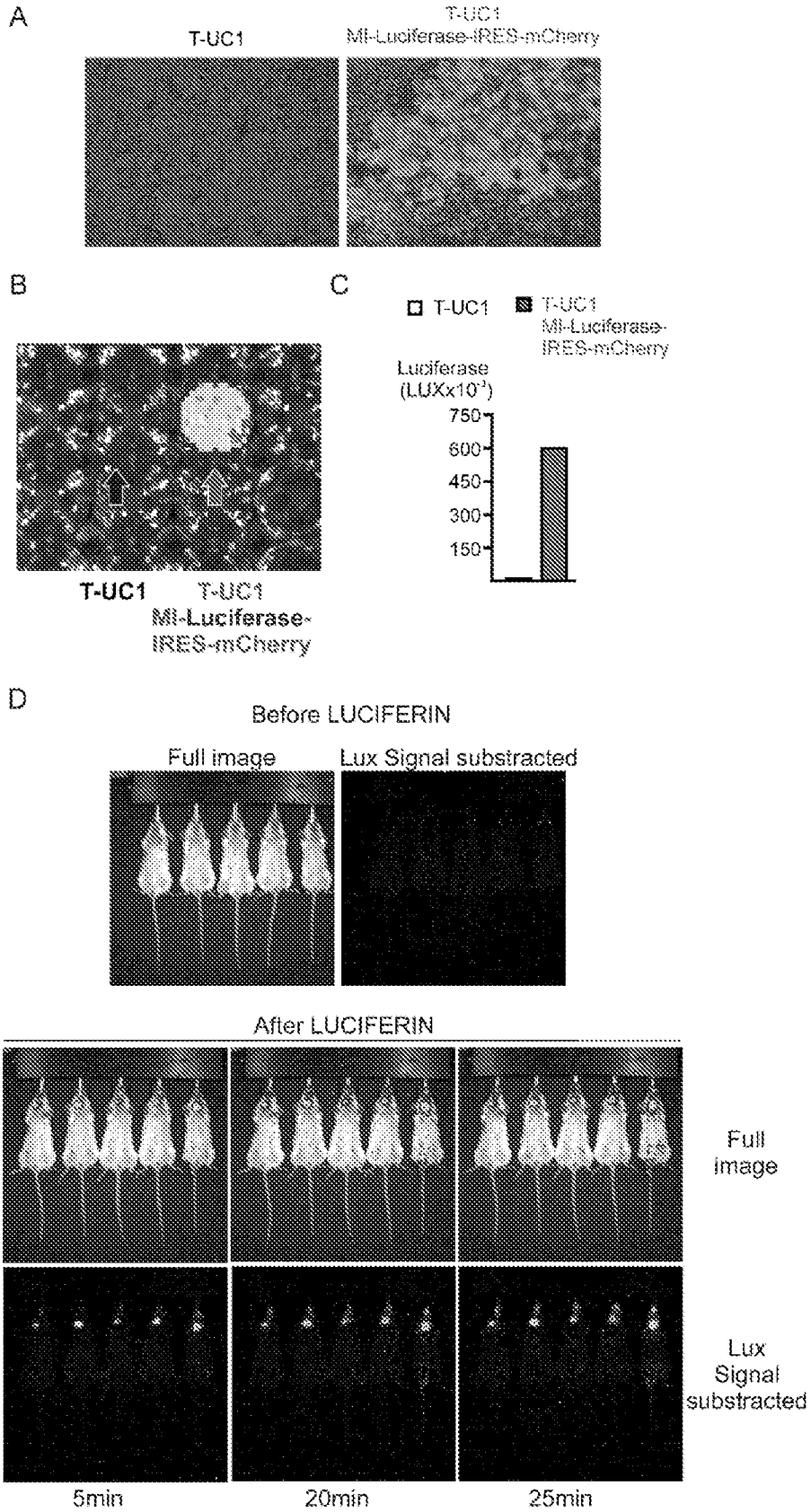

A
T-UC1
T-UC1
MI-Luciferase-IRES-mCherry
B
T-UC1
T-UC1
MI-Luciferase-
IRES-mCherry
C
T-UC1
T-UC1
MI-Luciferase-
IRES-mCherry
Luciferase
(LUXx10⁻³)
750
600
450
300
150
D
Before LUCIFERIN
Full image
Lux Signal substracted
After LUCIFERIN
Full
image
Lux
Signal
substracted
5min
20min
25min

Fig. 10

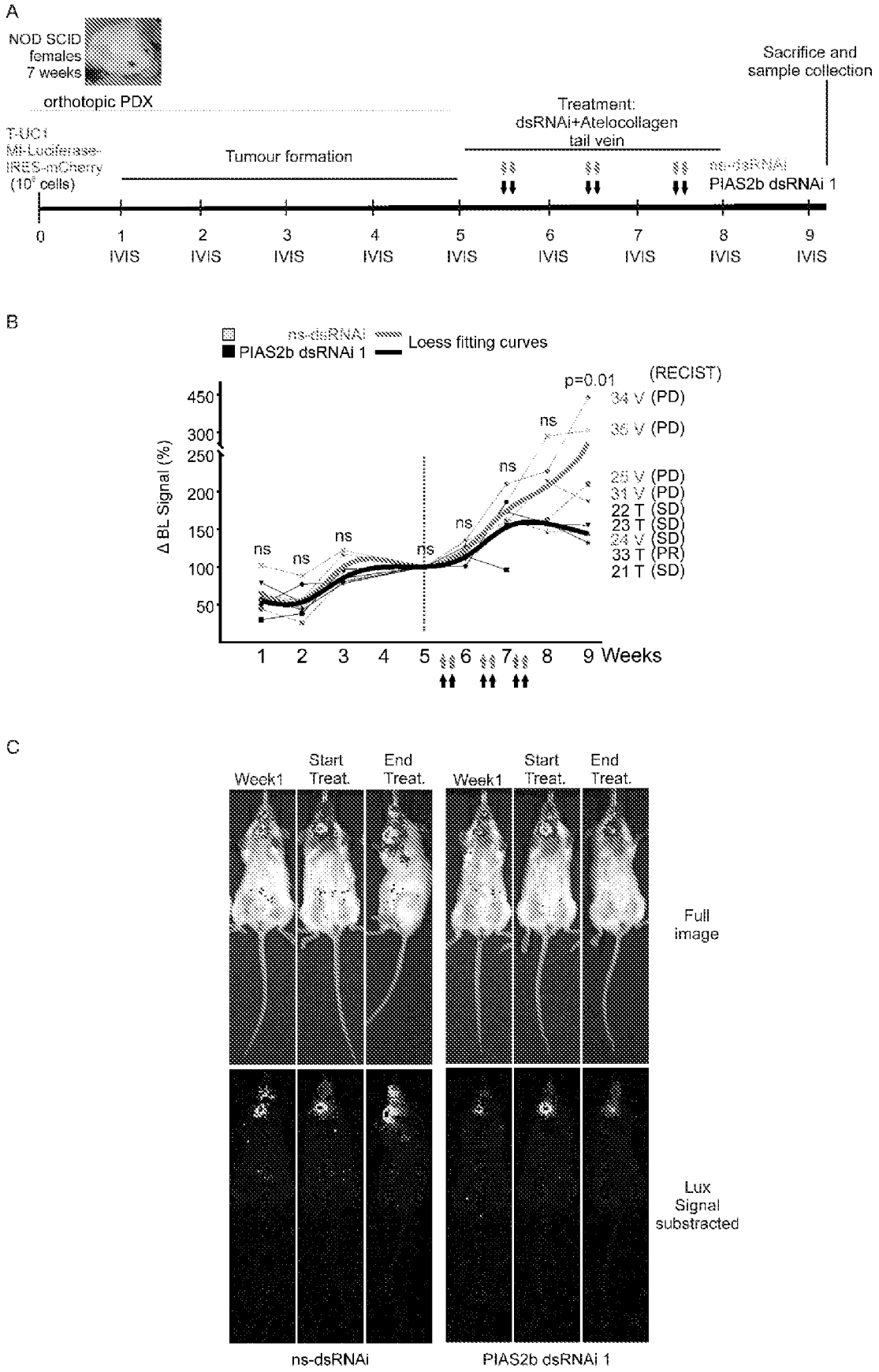
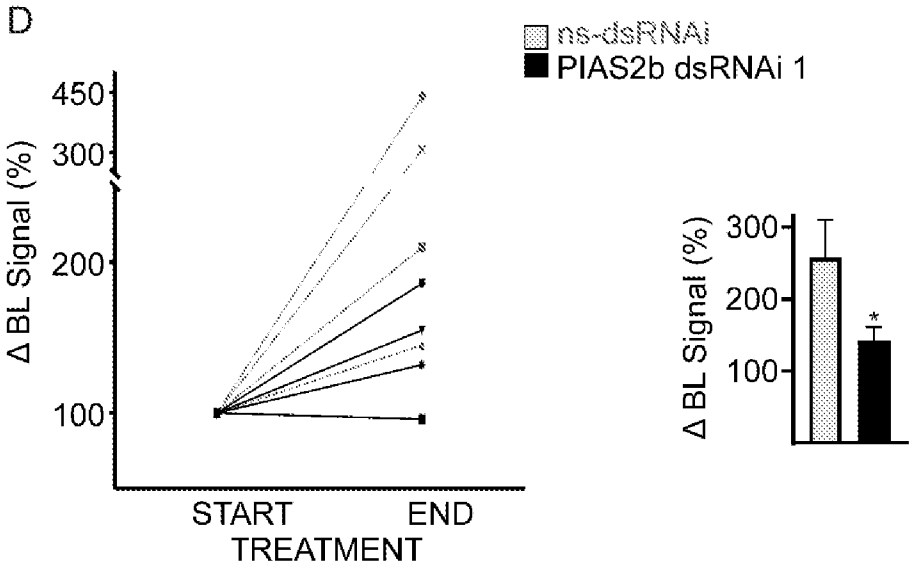
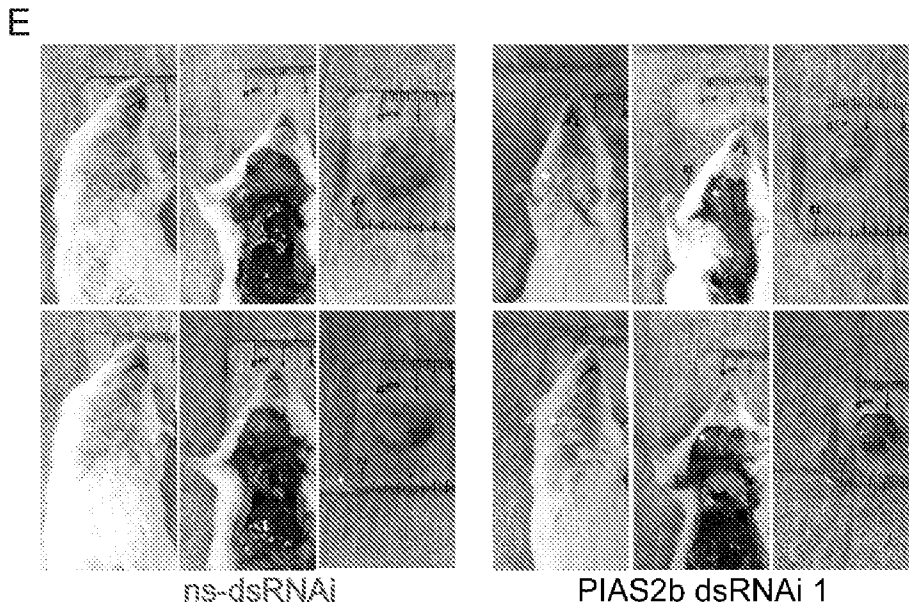

A
NOD SCID
females
7 weeks
orthotopic PDX
T-UC1
Mi-Luciferase-
IRES-mCherry
(10⁶ cells)
Tumour formation
Treatment:
dsRNAi+Atelocollagen
tail vein
Sacrifice and
sample collection
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1
0 1 IVIS 2 IVIS 3 IVIS 4 IVIS 5 IVIS 6 IVIS 7 IVIS 8 IVIS 9 IVIS
B
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1
Loess fitting curves
Δ BL Signal (%)
450
300
250
200
150
100
50
p=0.01
(RECIST)
34 V (PD)
36 V (PD)
25 V (PD)
31 V (PD)
22 T (SD)
23 T (SD)
24 V (SD)
33 T (PR)
21 T (SD)
ns
1 2 3 4 5 6 7 8 9 Weeks
C
Week1
Start
Treat.
End
Treat.
Full
image
Lux
Signal
substracted
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1

Fig. 11


D
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1
Δ BL Signal (%)
450
300
200
100
START
END
TREATMENT
Δ BL Signal (%)
300
200
100
*


E
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1

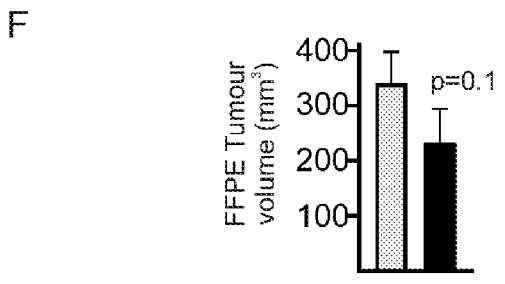

F
FFPE Tumour volume (mm³)
400
300
200
100
p=0.1

Fig 11 (cont.)

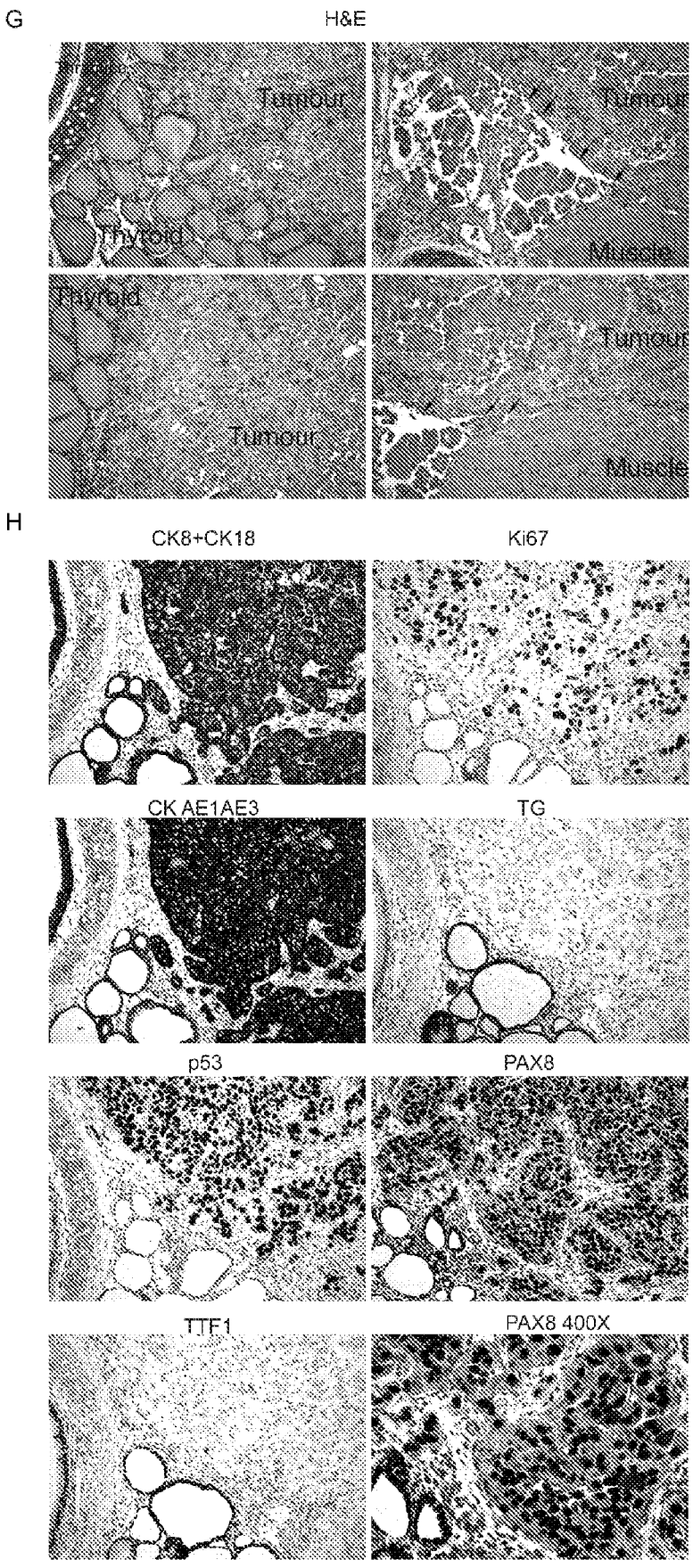

ns-dsRNAi
G
H&E
Tumour
Thyroid
Tumour
Muscle
Thyroid
Tumour
Tumour
Muscle
H
CK8+CK18
Ki67
CK AE1AE3
TG
p53
PAX8
TTF1
PAX8 400X

Fig 11(cont.)

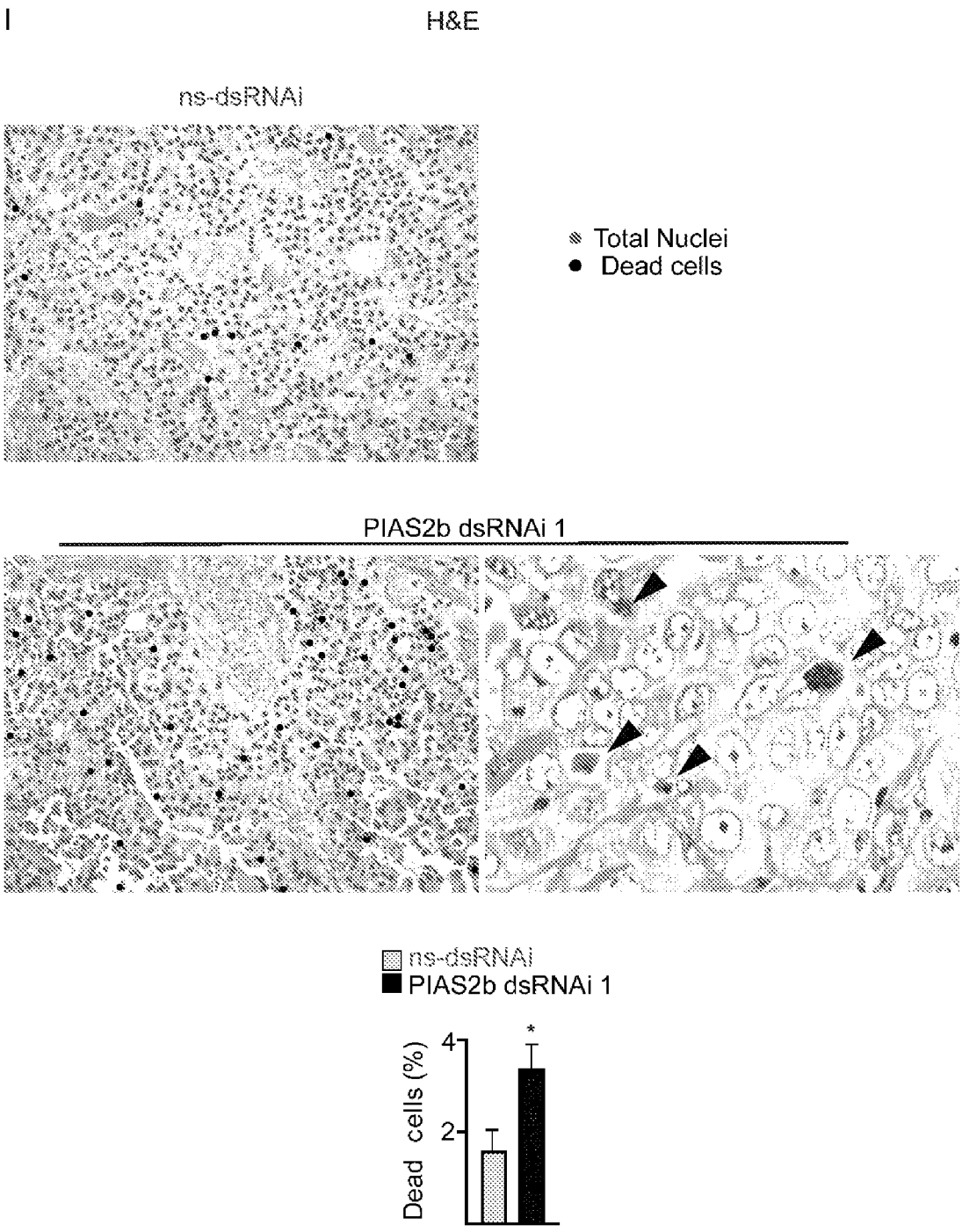

I
H&E
ns-dsRNAi
Total Nuclei
Dead cells
PIAS2b dsRNAi 1
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1
Dead cells (%)
4
2
*

Fig 11 (cont.)

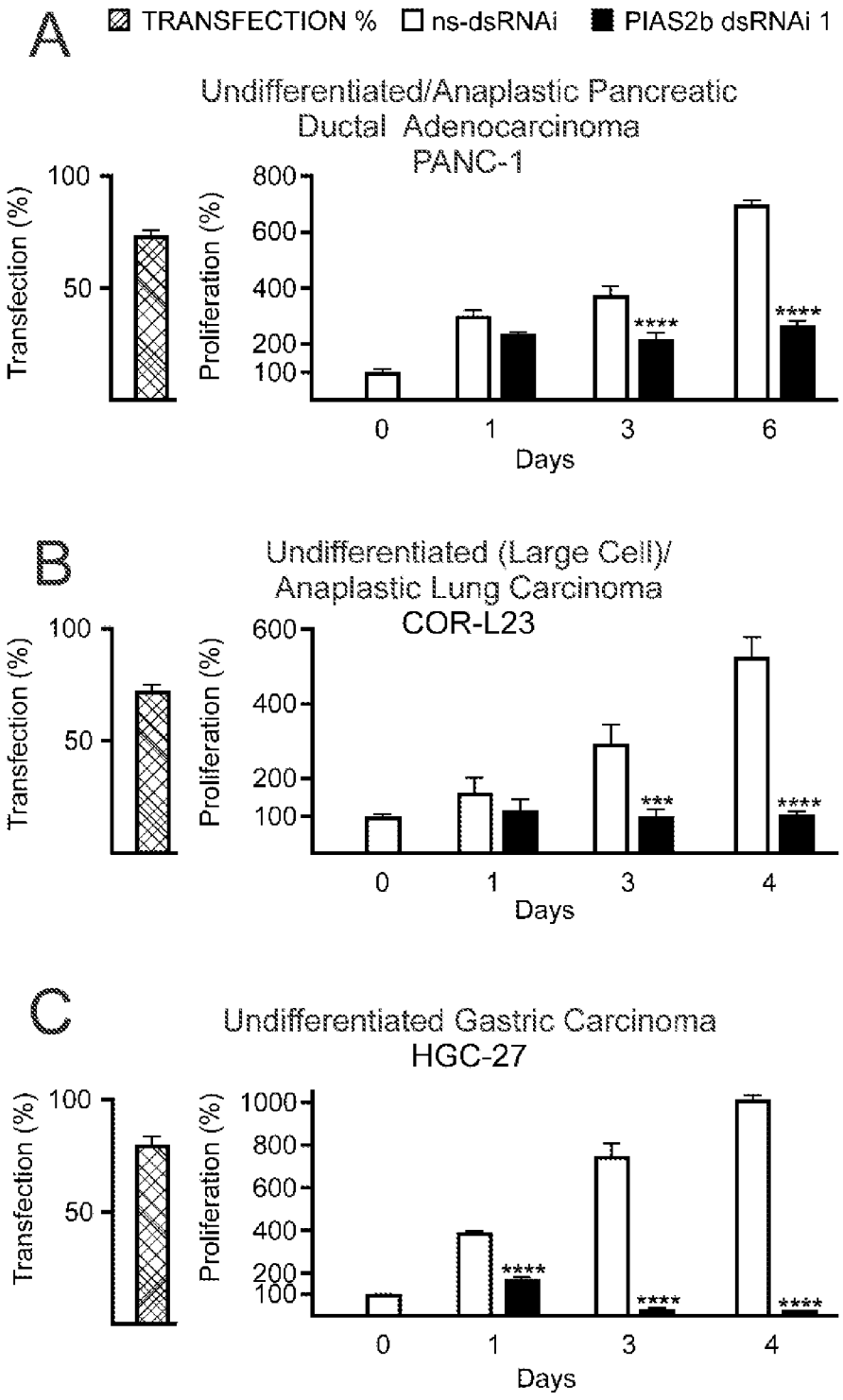

A
TRANSFECTION %
ns-dsRNAi
PIAS2b dsRNAi 1
Undifferentiated/Anaplastic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PANC-1
Transfection (%)
Proliferation (%)
Days
B
Undifferentiated (Large Cell)/ Anaplastic Lung Carcinoma
COR-L23
C
Undifferentiated Gastric Carcinoma
HGC-27

Fig 12