

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 387**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2007** **E 11196254 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013** **EP 2436782**

54 Título: **Mir-106a para diagnosticar adenocarcinoma de colon de pronóstico de supervivencia pobre**

30 Prioridad:

13.07.2006 US 807304 P
01.06.2007 US 932736 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2013

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (50.0%)
1524 North High Street
Columbus, OH 43201, US y
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH
AND HUMAN SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CROCE, CARLO;
SCHETTER, AARON y
HARRIS, CURTIS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 425 387 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mir-106a para diagnosticar adenocarcinoma de colon de pronóstico de supervivencia pobre

Antecedentes de la invención

El adenocarcinoma de colon es una causa principal de mortalidad por cáncer en todo el mundo¹. El cáncer colorrectal es el tercero más común y la segunda causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos². Los adenocarcinomas de colon esporádicos se inician como adenomas y evolucionan mediante una progresión de cambios moleculares, celulares e histológicos³. Aunque las tasas de mortalidad a 5 años se han reducido modestamente durante las últimas 3 décadas⁴, aún existe la necesidad de identificar nuevos biomarcadores de pronóstico y dianas terapéuticas para esta enfermedad. En la actualidad, la quimioterapia tiene valor terapéutico significativo pero la cirugía es la única forma curativa de tratamiento⁵.

Las dianas terapéuticas ideales deberían asociarse de forma causal con la enfermedad y ser susceptibles de diseño de intervenciones terapéuticas; mientras que los biomarcadores ideales deberían ser fáciles de medir y tener fuertes asociaciones con resultados clínicos. Los microARN podrían cumplir ambos criterios⁶⁻⁸.

Los microARN son moléculas de ARN no codificantes de 18-25 nucleótidos, que regulan la traducción de muchos genes⁹. Desde su descubrimiento^{10,11}, se ha hallado que regulan diversos procesos celulares incluyendo apoptosis¹²⁻¹⁴, diferenciación^{10, 11, 15} y proliferación celular¹⁶. Los microARN también pueden tener un papel causal en la carcinogénesis^{6,17}. Los niveles de expresión de microARN están alterados en la mayoría de los tipos tumorales^{18,19}, incluyendo los tumores de colon¹⁹⁻²². Los microARN miR-15 y miR-16a están suprimidos o regulados negativamente en la mayoría de las leucemias linfocíticas crónicas²³. La manipulación experimental de microARN específicos modula el desarrollo de tumores en sistemas de modelo de ratón^{16,24-26}. El potencial de pronóstico de los microARN también se ha demostrado para leucemia linfocítica crónica⁷, cáncer de pulmón⁸ y neuroblastomas²⁴.

La expresión de microARN aberrante puede ser causante de carcinogénesis, la inhibición de microARN específicos puede tener implicaciones terapéuticas. Pueden diseñarse oligonucleótidos antisentido modificados para inhibir específicamente la función de microARN²⁸. Los antagomir son un tipo de oligonucleótido antisentido que se ha demostrado que son eficaces en la inhibición de la función de microARN *in vivo* en ratones²⁹. La facilidad de diseñar inhibidores específicos de la función de microARN los hace candidatos para dianas terapéuticas.

Sumario de la invención

En un aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para diagnosticar si un sujeto tiene, está en riesgo de desarrollar o tiene un pronóstico de supervivencia reducido para una enfermedad relacionada con cáncer de colon. El procedimiento incluye medir el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo del sujeto, en el que una alteración en el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo, en relación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, la enfermedad relacionada con cáncer de colon. En un aspecto particular, el al menos un producto génico de miR se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos. En una realización, el producto génico de miR es miR-21.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento de ensayo para detectar al menos un inicio de, predisposición a o pronóstico de supervivencia reducido para una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon, que comprende:

(1) determinar un nivel de expresión de al menos un marcador en una muestra de un sujeto de ensayo; incluyendo el al menos un marcador al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos;

(2) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa (1) con un nivel de expresión de control del marcador en una muestra de un sujeto sano; y

(3) considerar que el sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon cuando el resultado de la comparación en la etapa (2) indica que: i) el nivel de expresión del al menos un marcador en el sujeto de ensayo es mayor que en el control o ii) el nivel de expresión del al menos un marcador en el sujeto de ensayo es menor que en el control.

La muestra puede comprender uno o más de tejido, sangre, plasma, suero, orina y heces. Además, todas las etapas del procedimiento pueden realizarse *in vitro*.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para diagnosticar si un sujeto tiene, está en riesgo de desarrollar o tiene un pronóstico de supervivencia reducido para una enfermedad relacionada con cáncer de colon, que comprende:

(1) transcribir de forma inversa ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de

oligodesoxinucleótidos diana;

(2) hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos para miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y

- 5 (3) comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado de una muestra de control, en el que una alteración en la señal de al menos un miARN es indicativa de que el sujeto tiene, está en riesgo de desarrollar o tiene un pronóstico de supervivencia reducido para una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

10 En un aspecto particular, la señal de al menos un miARN, en relación con la señal generada de la muestra de control, está regulada positiva o negativamente. Además, la micromatriz puede comprender oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

15 En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para inhibir tumorigénesis en un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el que al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos, está regulado negativamente o regulado positivamente en las células cancerosas del sujeto, en relación con las células de control, que comprende:

20 (1) cuando el al menos un producto génico de miR está regulado negativamente en las células cancerosas, administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR aislado seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos, de modo que la tumorigénesis se inhiba en el sujeto; o

(2) cuando el al menos un producto génico de miR está regulado positivamente en las células cancerosas, administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos, de modo que se inhiba la tumorigénesis en el sujeto.

25 En un aspecto particular, al menos un producto génico de miR aislado en la etapa (1) y/o en la etapa (2) es miR-21 o una variante aislada o fragmento biológicamente activo o equivalente funcional de los mismos, o un anticuerpo que se une a los mismos.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para inhibir la tumorigénesis en un sujeto que tiene un cáncer de colon, que comprende:

30 (1) determinar la cantidad de al menos un producto génico de miR en células cancerosas del sujeto, en relación con células de control; y

(2) alterar la cantidad de producto génico de miR expresado en las células cancerosas:

35 (i) administrando al sujeto una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR aislado seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos, si la cantidad del producto génico de miR expresado en las células cancerosas es menor que la cantidad del producto génico de miR expresado en las células de control; o

(ii) administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR, si la cantidad de producto génico de miR expresado en las células cancerosas es mayor que la cantidad del producto génico de miR expresado en células de control,

40 de modo que se inhiba la tumorigénesis en el sujeto.

En un aspecto particular, el al menos un producto génico de miR aislado en la etapa (i) es miR-21 o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo. Además, en ciertas realizaciones, el al menos un producto génico de miR en la etapa (ii) se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo de los mismos.

45 En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para identificar un inhibidor de tumorigénesis, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con un nivel de expresión alterado en una enfermedad relacionada con cáncer de colon, en el que un aumento o reducción en el nivel del producto génico de miR en la célula, en relación con una célula de control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de tumorigénesis.

50 En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para identificar un inhibidor de tumorigénesis, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con un nivel de expresión alterado en una enfermedad relacionada con cáncer de colon, en el que una reducción en el nivel del producto génico de miR en la célula, en relación con una célula de

control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de tumorigénesis.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un marcador para evaluar una o más rutas metabólicas que contribuyen a al menos uno de inicio, progresión, gravedad, patología, agresividad, grado, actividad, discapacidad, mortalidad, morbilidad, sub-clasificación de enfermedad u otra característica patógena o patológica subyacente de al menos una enfermedad relacionada con cáncer de colon, comprendiendo el marcador uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento una composición que comprende uno o más de los marcadores descritos en el presente documento.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para identificar un potencial para el inicio o desarrollo de al menos una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un sujeto, proporcionando el procedimiento medir uno o más de los marcadores descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, están presentes uno o más marcadores en una muestra aislada y todas las etapas del procedimiento se realizan *in vitro*.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un reactivo para ensayos para detectar una enfermedad relacionada con cáncer de colon, comprendiendo el reactivo un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de al menos un marcador descrito en el presente documento o una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos del marcador.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un reactivo para ensayos para detectar una enfermedad relacionada con cáncer de colon, comprendiendo el reactivo un anticuerpo que reconoce una proteína codificada por al menos un marcador descrito en el presente documento.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento una microplaca de ADN para ensayos para detectar una enfermedad relacionada con cáncer de colon, en la que se ha inmovilizado una sonda para ensayar al menos un marcador descrito en el presente documento.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para evaluar la eficacia de una terapia para prevenir, diagnosticar y/o tratar al menos una enfermedad relacionada con cáncer de colon que comprende:

1) someter a un animal a una terapia cuya eficacia se está evaluando, y

2) determinar el nivel de eficacia del tratamiento que se ensaya en el tratamiento o prevención de la enfermedad relacionada con cáncer de colon evaluando al menos un marcador descrito en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico candidato comprende uno o más de: composiciones farmacéuticas, composiciones nutracéuticas y composiciones homeopáticas. Además, la terapia que se evalúa puede ser para su uso en un sujeto humano. En ciertas realizaciones, el procedimiento no es un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para evaluar el potencial de al menos un material con respecto a una capacidad para iniciar una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon en un modelo animal, proporcionando el procedimiento:

1) medir una o más de marcadores regulados positiva o negativamente descritos en el presente documento después de exposición del animal a uno o más materiales en cantidades suficientes para iniciar una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon en el animal; y

2) determinar si al menos uno de los marcadores regulados positiva o negativamente tiene la capacidad para iniciar una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de colon, que comprende: al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica para tratar un cáncer de colon, que comprende al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR es específico para un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un artículo de fabricación que comprende: al menos un reactivo de captura que se une a un marcador para una enfermedad relacionada con cáncer de colon

seleccionada de al menos uno de los marcadores descritos en el presente documento.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un kit para explorar con respecto a un compuesto candidato para un agente terapéutico para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de colon, comprendiendo el kit: uno o más reactivos de al menos un marcador descrito en el presente documento, y una célula que expresa al menos un marcador. En ciertas realizaciones, la presencia del marcador se detecta usando un reactivo que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente con al menos un marcador. Además, en ciertas realizaciones, el reactivo está marcado, radio-marcado o marcado con biotina y/o el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima. En una realización particular, el kit incluye además un recipiente que comprende al menos uno de los marcadores. Además, el reactivo puede comprender uno o más de: un anticuerpo, una sonda con la que se une o puede unirse el reactivo, y un quelado metálico inmovilizado.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un ensayo de exploración con respecto a una enfermedad relacionada con cáncer de colon que comprende:

poner en contacto uno o más de los marcadores de la reivindicación 20 con un sustrato para dicho marcador y con un agente de ensayo y

determinar si el agente de ensayo modula la actividad del marcador.

En ciertas realizaciones, todas las etapas del procedimiento pueden realizarse *in vitro*.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento una micromatriz para predecir la presencia de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un sujeto que comprende un anticuerpo dirigido a al menos un marcador de la reivindicación 20.

En otro aspecto general, se proporcionan en el presente documento procedimientos, composiciones y similares, en el que se evalúa un nivel de expresión del marcador detectando la presencia de un polinucleótido transcrito o parte del mismo, comprendiendo el polinucleótido transcrito una región codificante del marcador. Además, la muestra puede ser un fluido corporal o tejido asociado a cáncer de colon. En una realización particular, la muestra comprende células obtenidas del paciente.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para tratar, prevenir, invertir o limitar la gravedad de una complicación de enfermedad relacionada con cáncer de colon en un individuo que lo necesite, que comprende:

administrar al individuo un agente que interfiera con al menos una ruta de señalización de respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon, en una cantidad suficiente para interferir con dicha señalización, en el que el agente comprende al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento el uso de un agente que interfiere con al menos una ruta de señalización de respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir, invertir o limitar la gravedad de una complicación de enfermedad relacionada con cáncer de colon en un individuo, en el que el agente comprende al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento para tratar, prevenir, invertir o limitar la gravedad de una complicación de enfermedad relacionada con cáncer de colon en un individuo que lo necesite, que comprende administrar al individuo un agente que interfiera con al menos una cascada de respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon, en el que el agente comprende al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento el uso de un agente que interfiere con al menos una cascada de respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir, invertir o limitar la gravedad de una complicación de enfermedad relacionada con cáncer de colon en un individuo, en el que el agente comprende al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un medio leíble por ordenador que comprende una base de datos que tiene una pluralidad de perfiles de referencia codificados digitalmente, en el que al menos un primer perfil de referencia representa un nivel de al menos un primer marcador en una o más muestras de uno o más sujetos que muestran un indicio de una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon,

en el que el marcador comprende uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, el medio leíble por ordenador incluye al menos un segundo perfil de referencia que representa un nivel de al menos un segundo marcador en una o más muestras de uno o más sujetos que muestran indicios de una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon; o sujetos que tienen una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

- 5 En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un sistema informático para determinar si un sujeto tiene, está predispuesto a tener o tiene un pronóstico de supervivencia pobre para una enfermedad relacionada con cáncer de colon que comprende la base de datos descrita en el presente documento y un servidor que comprende un código ejecutable por ordenador para hacer que el ordenador reciba un perfil de un sujeto, identificar de la base de datos un perfil de referencia coincidente que sea diagnósticamente relevante para el perfil del sujeto; y generar un indicio de si el sujeto tiene, o está predispuesto para tener, una enfermedad relacionada con

10 del sujeto; y generar un indicio de si el sujeto tiene, o está predispuesto para tener, una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un procedimiento asistido por ordenador para evaluar la presencia, ausencia, naturaleza o alcance de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un sujeto, que comprende:

- 15 1) proporcionar un ordenador que comprende un modelo o algoritmo para clasificar datos de una muestra obtenida del sujeto, en el que la clasificación incluye analizar los datos con respecto a la presencia, ausencia o cantidad de al menos un marcador, en el que el marcador comprende uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos;
- 2) Introducir datos de la muestra biológica obtenida del sujeto; y
- 20 3) clasificar la muestra biológica para indicar la presencia, la ausencia, la naturaleza o el alcance de una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

En otro aspecto general, al menos un producto génico de miR y combinaciones de los mismos incluye variantes aisladas o fragmentos biológicamente activos o equivalentes funcionales de los mismos, o anticuerpos que se unen a los mismos.

- 25 En otro aspecto general, se proporciona en el presente documento un modelo animal para cáncer de colon en el que al menos uno de los siguientes procesos biológicos o químicos se produce en el modelo animal. La regulación positiva o negativa de uno o más productos génicos de miR se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el modelo animal es un vertebrado no humano. En realizaciones particulares, el modelo animal es un ratón, una rata, un conejo o un primate.

30 Resultarán evidentes diversos objetos y ventajas de la presente invención para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferida, cuando se lea a la luz de los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

- 35 El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color se proporcionarán por la oficina a petición y tras el pago de la tarifa necesaria.

Figuras 1a - 1g: miR-21 se expresa a niveles mayores en adenocarcinomas de colon con expresión creciente en tumores más avanzados.

- 40 (Figura 1a) La hibridación *in situ* para miR-21 se optimizó para distinguir expresiones alta y baja de miR-21. Las células epiteliales colónicas en tumor humano (T) expresan niveles mayores de miR-21 en comparación con tejido no tumoral adyacente (N). (Figura 1c) Los núcleos y el citoplasma de células epiteliales colónicas en tejido tumoral expresan cantidades significativas de miR-21 en tejido tumoral, a alto aumento. (Figura 1e) El tejido no tumoral no muestra expresión significativa de miR-21 al mismo aumento.

- 45 (Figura 1b, Figura 1d, Figura 1f) La sonda de control de mezcla no muestra tinción significativa a aumento bajo o alto en secciones de serie de tejido tumoral y no tumoral, como se esperaba. Las barras de escala (Figuras 1 c-f) indican que miR-21 500 μ M (g) se expresa a mayores niveles en tumores más avanzados. Las representaciones de puntos representan los valores de Ct relativos de miR-21 (de RT-PCR cuantitativa) para niveles de expresión de adenoma y tumor que se han normalizado con tejidos no de adenoma emparejados o no tumorales, respectivamente. Los tipos tisulares se han ordenado de adenoma a tumores en estadio I-IV. Las barras indican la mediana del valor. Hay una
- 50 tendencia significativa a que los tumores más avanzados tengan mayor expresión de miR-21 (ensayo no paramétrico para tendencia entre grupos ordenados).

Figura 2: miR-21 se expresa a mayores niveles en tumores más avanzados. Se usaron micromatrices de microARN para medir los niveles de expresión de miR-21. Las representaciones de puntos representan $\log_2$ (relaciones de tumor/no tumor) de miR-21 como se calcula a partir de micromatrices de microARN de la cohorte original. La sonda

hsa-miR-21-prec 17 N° 1 de micromatriz se usó para medir la expresión de miR-21. Se excluyeron los tejidos con expresión indetectable de miR-21 basándose en los datos de micromatriz. Se han ordenado tipos tisulares de tumores TNM de estadio I a estadio IV. Las barras indican la mediana del valor. Existe una tendencia significativa a que los tumores más avanzados tengan mayor expresión de miR-21 ($p = 0,04$; ensayo no paramétrico con respecto a la tendencia entre grupos ordenados).

Figuras 3a y 3b: La expresión alta de miR-21 en tumores predice una escasa supervivencia en sujetos con histología de adenocarcinoma típica en ambas cohortes independientes. Este análisis excluye sujetos con histología de adenocarcinoma mucinoso o carcinoma adenoescamoso.

(Figura 3a) Se usaron micromatrices de microARN en la cohorte de ensayo de Maryland para medir los niveles de expresión de microARN de tumores y tejidos no tumorales. Los tejidos con expresión indetectable de miR-21 basada en datos de micromatrices se excluyeron. La expresión alta de miR-21 se clasificó basándose en el tercil más alto. Las líneas rojas indican individuos con alta expresión mientras que las líneas verdes corresponden a baja expresión. Para tejido no tumoral, se clasificaron 24/69 tejidos como altos mientras que se clasificaron 26/72 tumores como altos. La expresión alta de miR-21 en tumores (derecha) se asocia con escasa supervivencia mientras que no está asociada en tejido no tumoral.

(Figura 3b) Validación de la asociación con expresión de miR-21 alta en tumores y pronóstico negativo en una cohorte independiente. Se midieron los niveles de expresión de miR-21 mediante RT-PCR cuantitativa. La expresión alta se basa en el tercil más alto. 35/103 tejidos no tumorales se clasificaron como altos y 34/103 tejidos tumorales se clasificaron como altos. Los p-valores son p-valores de rango logarítmico de análisis de Kaplan-Meier. Las X en todas las líneas indican el momento en el que se censuró a un individuo.

Figuras 4a y 4b: la alta expresión de miR-21 en tumores predice escasa supervivencia en ambas cohortes independientes. Este análisis incluye a todos los sujetos independientemente de la histología del adenocarcinoma.

(Figura 4a) se usaron micromatrices de microARN en la cohorte de ensayo de Maryland para medir los niveles de expresión de microARN de tumores y tejidos no tumorales. Se excluyeron los tejidos con expresión indetectable de miR-21 basándose en datos de micromatrices. La expresión alta de miR-21 se clasificó basándose en el tercil más alto. Las líneas rojas indican individuos con alta expresión mientras que las líneas verdes corresponden a baja expresión. Para tejidos no tumorales, 26/74 tejidos se clasificaron como altos mientras que 28/79 tumores se clasificaron como altos. La expresión alta de miR-21 en tumores (derecha) se asocia con escasa supervivencia mientras que no está asociado en tejido no tumoral.

(Figura 4b) Validación de la asociación con alta expresión de miR-21 en tumores y mal pronóstico en una cohorte independiente. Los niveles de expresión de miR-21 se midieron mediante RT-PCR cuantitativa. La alta expresión se basa en el tercil más alto, 37/111 tejidos no tumorales se clasificaron como altos y 37/111 tejidos tumorales se clasificaron como altos. Todos los p valores son p valores de rango logarítmico de análisis de Kaplan-Meier. Las X en todas las líneas indican el momento en el que se censuró a un individuo.

Figuras 5a, 5b y 5c: la expresión alta de miR-21 se asocia con una escasa respuesta a quimioterapia adyuvante para casos con histología de adenocarcinoma convencional. Este análisis incluye sujetos de la cohorte de validación, excluyendo sujetos con adenocarcinoma mucinoso o histologías de carcinoma adenoescamoso.

(Figura 5a) comparación de las tasas de supervivencia para sujetos de TNM estadio II/III con histología de adenocarcinoma convencional mediante los niveles de expresión de miR-21 y recepción de la quimioterapia adyuvante. Para los 77 sujetos de estadio II/III, 25 se clasificaron como miR-21 bajo receptores de terapia, 28 como miR-21 bajo y no receptores de terapia, 11 como miR-21 alto receptores de terapia y 13 como miR-21 alto y no receptores de terapia. Para los sujetos de estadio II/III que recibieron quimioterapia adyuvante, la expresión alta de miR-21 en tumores se asocia con una escasa supervivencia ($p = 0,03$).

(Figura 5b) comparación de sujetos de TNM de estadio II con histología de adenocarcinoma convencional. Para los 33 sujetos de estadio II, 8 se clasificaron como miR-21 bajo receptores de terapia, 15 como miR-21 bajo y no receptores de terapia, 3 como miR-21 alto receptores de terapia y 7 como miR-21 alto y no receptores de terapia. Todos los sujetos de estadio II que recibieron quimioterapia sobrevivieron durante el transcurso de este estudio.

(Figura 5c) comparación de sujetos de TNM de estadio III con histología de adenocarcinoma convencional. Para los 44 sujetos de estadio III, 17 se clasificaron como miR-21 bajo receptores de terapia, 13 como miR-21 bajo y no receptores de terapia, 8 como miR-21 alto receptores de terapia y 6 como miR-21 alto y no receptores de terapia. Para sujetos del estadio III que recibieron quimioterapia adyuvante, la expresión alta de miR-21 en tumores se asocia con una escasa supervivencia ($p = 0,02$). Las X en todas las líneas indican el momento en el que se censuró a un individuo.

Figuras 6a, 6b y 6c: análisis combinado de cohorte de ensayo de Maryland y cohorte de validación de Hong Kong que examina las asociaciones entre la expresión de miR-21 en tumores y la recepción de quimioterapia adyuvante con pronóstico. Este análisis incluye todos los sujetos de TNM de estadio II/III de ambas cohortes. Se excluyeron individuos con histologías de adenocarcinoma mucinoso o carcinoma adenoescamoso. La columna izquierda incluye

representaciones de Kaplan-Meier que analizan la asociación entre la recepción de terapia de adyuvante y pronóstico. La columna central incluye análisis de la asociación entre expresión alta de miR-21 en tumores y pronóstico, y la columna derecha subdivide los individuos basándose tanto en quimioterapia como en estado de expresión de miR-21.

5 (Figura 6a) Todos los sujetos de TNM de estadio II/III. Para los 119 sujetos de estadio II/III, 40 se clasificaron como miR-21 bajo receptores de terapia, 41 como miR-21 bajo y no receptores de terapia, 16 como miR-21 alto receptores de terapia y 22 como miR-21 alto y no receptores de terapia. La expresión alta de miR-21 se asocia con una escasa supervivencia para los que reciben quimioterapia ($p = 0,003$), así como los que no reciben terapia ($p = 0,04$).

10 (Figura 6b) Todos los sujetos de TNM de estadio II. Para los 52 sujetos de estadio II/III, 10 se clasificaron como miR-21 bajo receptores de terapia, 25 como miR-21 bajo y no receptores de terapia, 4 como miR-21 alto receptores de terapia y 13 como miR-21 alto y no receptores de terapia. Las asociaciones entre expresión alta de miR-21 y pronóstico no fueron estadísticamente significativas en individuos que recibieron quimioterapia ($p = 0,11$) o los que no recibieron quimioterapia ($p = 0,06$).

15 (Figura 6c) Todos los sujetos de TNM de estadio III. Para los 67 sujetos de estadio III, 30 se clasificaron como miR-21 bajo que recibieron terapia, 16 como miR-21 bajo y que no recibieron terapia, 12 como miR-21 alto que recibieron terapia y 9 como miR-21 alto y que no recibieron terapia. La expresión alta de miR-21 se asocia significativamente con escasa supervivencia en sujetos de estadio III que recibieron quimioterapia ($p = 0,007$), pero no en sujetos que no recibieron quimioterapia ($p = 0,30$). Las X en todas las líneas indican el momento en el que se censuró a un individuo.

20 Figuras 7a - 7c. Se asocian perfiles de miARN globales con clasificación de estadio de TNM clínico y pronóstico de supervivencia. La agrupación jerárquica de relaciones TIN de miARN dio como resultado la formación de dos grupos denominados arbitrariamente grupo A y grupo B. El mapa de HEAT resultante y asignaciones de grupos se muestran en la Figura 7a. Estos dos grupos estaban compuestos de individuos con pronósticos de supervivencia significativamente diferentes para estadios de TNM, siendo más probable que los individuos de grupo B se diagnostiquen como estadio III o IV en comparación con individuos del grupo A (Figura 7b). El análisis de Kaplan-Meier muestra que los individuos del grupo B también tienen un peor pronóstico de supervivencia (Figura 7c).

Figuras 8a - 8i. Las relaciones de TIN de miARN individuales son predictivas del pronóstico de supervivencia. Se presentan en el presente documento gráficos que muestran las relaciones de TIN por determinación de estadios de TNM (izquierda) y análisis de Kaplan-Meier (derecha) para cada uno de estos 9 miARN. El eje Y (gráficos de relación de TIN por estadio de TNM) indica la relación de TIN transformada en log (2) para cada individuo mientras que el eje X agrupa a los individuos por estadios de TNM (I, II, III o IV). Los valores de significación mostrados son el resultado de un ensayo no paramétrico con respecto a la tendencia de los valores de relación de TIN medios entre individuos agrupados por estadio. Las representaciones de Kaplan-Meier incluyen todos los individuos con datos de relación de TIN para ese miARN particular. Los inventores descubrieron que las relaciones de TIN se asociaban tanto con el estadio clínico como con el pronóstico de supervivencia.

Figuras 9a y 9b. Una identificación de miARN de 9 miARN predice riesgo de muerte por cáncer de colon. Se mostró que cada una de las relaciones de TIN de miR-21, miR-106a, miR181b, miR-16b, miR-203, let-7 g, miR-29a, miR-103-2 y miR-10a era predictiva de pronóstico de cáncer de colon. La agrupación jerárquica de relaciones de TIN de estos 9 miARN dio como resultado la división de los individuos en dos grupos (1A) con pronósticos de supervivencia significativamente diferentes (1B). Los individuos del grupo B tenían un riesgo significativamente mayor de morir de cáncer de colon que los del grupo A. Los individuos se excluyeron de este análisis si carecían de más de 2 de las 9 relaciones de TIN que componían la identificación de miARN.

Descripción detallada de la realización preferida

En un aspecto general, se proporciona en el presente documento la identificación de microARN particulares cuya expresión está alterada en células cancerosas asociadas con cánceres de colon diferentes, en relación con células de control normales.

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

La molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa puede obtenerse del precursor de miR mediante rutas de procesamiento naturales (por ejemplo, usando células intactas o lisados celulares) o mediante rutas de procesamiento sintéticas (por ejemplo, usando enzimas de procesamiento aisladas, tales como Dicer, Argonaut o

RNasa III aislada). Se entiende que la molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa también puede producirse directamente por síntesis biológica o química, sin haber sido procesada desde el precursor de miR. Cuando se hace referencia a un microARN en el presente documento por nombre, el nombre corresponde a las formas tanto precursoras como maduras, a no ser que se indique de otro modo.

- 5 En un aspecto, se proporcionan en el presente documento procedimientos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer de colon, que comprenden medir el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo del sujeto y comparar el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control. Como se usa en el presente documento, un “sujeto” puede ser cualquier mamífero que tenga, o se sospeche que tiene, un cáncer sólido. En una
10 realización preferida, el sujeto es un ser humano que tiene, o se sospecha que tiene, un cáncer de colon.

En una realización, el al menos un producto génico de miR medido en la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el producto génico de miR es miR-21.

- 15 La enfermedad relacionada con cáncer de colon puede ser cualquier trastorno o cáncer que surja de los tejidos de colon. Dichos cánceres están asociados normalmente con la formación y/o presencia de masas tumorales y pueden ser, por ejemplo, adenocarcinomas.

En una realización, el colon es un adenocarcinoma y el al menos un producto génico de miR medido en la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

- 20 En una realización adicional, el al menos un producto génico de miR medido en la muestra de ensayo es miR-21.

- El nivel de al menos un producto génico de miR puede medirse en una muestra biológica (por ejemplo, células, tejidos) obtenida del sujeto. Por ejemplo, una muestra tisular (por ejemplo, de un tumor) puede retirarse de un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon por técnicas de biopsia convencionales. En otra realización, una muestra de sangre puede retirarse del sujeto, y pueden aislarse células
25 sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos) para extracción de ADN por técnicas convencionales. La muestra de sangre o tisular se obtiene preferentemente del sujeto antes del inicio de la radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento terapéutico. Puede obtenerse una muestra tisular o de sangre de control correspondiente de tejidos no afectados del sujeto, de un individuo humano normal o una población de individuos normales, o de células cultivadas correspondientes a la mayoría de células en la muestra del sujeto. La muestra de sangre o tisular de control se
30 procesa después junto con la muestra del sujeto, de modo que puedan compararse los niveles del producto génico de miR producido de un gen de miR dado en células de la muestra del sujeto con los niveles del producto génico de miR correspondientes de células de la muestra de control. Un patrón de expresión de miR de referencia para la muestra biológica puede usarse también como un control.

- 35 Una alteración (por ejemplo, un aumento o reducción) en el nivel de un producto génico de miR en la muestra obtenida del sujeto, en relación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el sujeto.

- En una realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra de control (es decir, la expresión del producto génico de miR está “regulada positivamente”). Como se usa en el presente documento, la expresión de un producto génico de
40 miR está “regulada positivamente” cuando la cantidad de producto génico de miR en una muestra celular o tisular de un sujeto es mayor que la cantidad del mismo producto génico en una muestra celular o tisular de control.

- En otra realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra de control (es decir, la expresión del producto génico de miR está “regulada negativamente”). Como se usa en el presente documento, la expresión de un gen de miR está
45 “regulada negativamente” cuando la cantidad del producto génico de miR producido a partir de ese gen en una muestra celular tisular de un sujeto es menor que la cantidad producida del mismo gen en una muestra celular o tisular de control.

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

- El nivel de un producto génico de miR en una muestra puede medirse usando cualquier técnica que sea adecuada para detectar niveles de expresión de ARN en una muestra biológica. Se conocen bien por los expertos en la
55 materia técnicas adecuadas (por ejemplo, análisis de transferencia de Northern, RT-PCR, hibridación *in situ*) para determinar los niveles de expresión de ARN en una muestra biológica (por ejemplo, células, tejidos). En una realización particular, el nivel de al menos un producto génico de miR se detecta usando análisis de transferencia de

Northern. Por ejemplo, el ARN celular total puede purificarse de células por homogeneización en presencia de tampón de extracción de ácido nucleico, seguido de centrifugación. Los ácidos nucleicos se precipitan y el ADN se retira por tratamiento con DNasa y precipitación. Las moléculas de ARN se separan después por electroforesis en gel en geles de agarosa de acuerdo con técnicas convencionales, y se transfieren a filtros de nitrocelulosa. El ARN se inmoviliza después en los filtros por calentamiento. La detección y cuantificación de ARN específico se consigue usando sondas de ADN o ARN marcadas de forma apropiada complementarias del ARN en cuestión. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook et al, eds, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 7.

Pueden producirse sondas adecuadas para hibridación de transferencia de Northern de un producto génico de miR dado a partir de las secuencias de ácido nucleico e incluyen, pero sin limitación, sondas que tienen al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o complementariedad completa con un producto génico de miR de interés. Se describen procedimientos para la preparación de sondas de ADN y ARN marcadas y las condiciones de hibridación de las mismas para dirigirse a secuencias de nucleótidos en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook et al, eds, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, capítulos 10 y 11.

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

Las sondas pueden marcarse para alta actividad específica mediante el procedimiento de traslación por muescas de Rigby et al. (1977). *J. Mol. Biol.* 113:237-251 o mediante el procedimiento de cebadores aleatorios de Fienberg et al. (1983), *Anal. Biochem.* 132:6-13. Este último es el procedimiento elegido para sintetizar sondas marcadas con ^{32}P de alta actividad específica de ADN monocatenario o de moldes de ARN. Por ejemplo, reemplazando nucleótidos preexistentes con nucleótidos altamente radiactivos de acuerdo con el procedimiento de traslación por muescas, es posible preparar sondas de ácido nucleico marcadas con ^{32}P con una actividad específica bastante mayor de 10^8 cpm/microgramo. Puede realizarse después detección autorradiográfica de hibridación exponiendo filtros hibridados a película fotográfica. La exploración densitométrica de las películas fotográficas expuestas por los filtros hibridados proporciona una medición precisa de los niveles de transcrito génico de miR. Usando otro enfoque, los niveles de transcrito génico de miR pueden cuantificarse por sistemas de captura de imágenes informáticos, tales como el *Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager* disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

Cuando no es práctico el marcaje con radionúclido de sondas de ADN o ARN, puede usarse el procedimiento de cebador aleatorio para incorporar un análogo, por ejemplo, el análogo de dTTP 5-(N-(N-biotinil-apsilon-aminocaproil)-3-aminoalil) desoxiuridina trifosfato, en la molécula sonda. El oligonucleótido sonda biotinilado puede detectarse mediante reacción con proteínas de unión a biotina, tales como avidina, estreptavidina, y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-biotina) acoplados a colorantes fluorescentes o enzimas que producen reacciones de color.

Además de Northern y otras técnicas de hibridación de ARN, puede conseguirse determinar los niveles de transcritos de ARN usando la técnica de hibridación *in situ*. Esta técnica requiere menos células que la técnica de transferencia de Northern, e implica depositar células completas en un cubreobjetos de microscopio y explorar el contenido de ácido nucleico de la célula con una solución que contiene sondas de ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ARN) radiactivas o marcadas de otro modo. Esta técnica está particularmente bien adaptada a analizar muestras de biopsia tisular de sujetos. La práctica de la técnica de hibridación *in situ* se describe en más detalle en la Patente de Estados Unidos Nº 5.427.916.

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

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

En algunos casos, puede ser deseable determinar simultáneamente el nivel de expresión de una pluralidad de productos génicos de miR diferentes en una muestra. En otros casos, puede ser deseable determinar el nivel de expresión de los transcritos de todos los genes de miR conocidos correlacionados con un cáncer. La evaluación de los niveles de expresión específicos de cáncer de cientos de genes o productos génicos de miR consume mucho tiempo y requiere una gran cantidad de ARN total (por ejemplo, al menos 20 µg para cada transferencia de Northern)

y técnicas autorradiográficas que requieren isótopos radiactivos.

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

Como se usan en el presente documento, "oligonucleótido sonda" o "oligodesoxinucleótido sonda" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridar con un oligonucleótido diana. "Oligonucleótido diana" o "oligodesoxinucleótido diana" se refiere a una molécula para detectar (por ejemplo, mediante hibridación). Por "oligonucleótido sonda específico de miR" u "oligonucleótido sonda específico para una miR" se entiende un oligonucleótido sonda que tiene una secuencia seleccionada para hibridar con un producto génico de miR específico, o a un transcrito inverso del producto génico de miR específico.

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

En un ejemplo no limitante, puede evaluarse un régimen de tratamiento particular (por ejemplo, para determinar si un fármaco quimioterapéutico actúa para mejorar el pronóstico a largo plazo en un paciente particular). De forma similar, puede realizarse o confirmarse el diagnóstico comparando muestras de pacientes con perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión (o genes individuales) permiten la exploración de candidatos farmacológicos que suprimen el perfil de expresión de cáncer de colon o convierten un perfil de pronóstico negativo en un mejor perfil de pronóstico.

En consecuencia, también se proporcionan en el presente documento procedimientos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer de colon, que comprenden transcribir de forma inversa ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control o patrón de referencia, en el que una alteración de la señal de al menos un miARN es indicativa de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer sólido.

En una realización, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para una parte sustancial de todos los miARN humanos conocidos. En una realización particular, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

La micromatriz puede prepararse a partir de sondas oligonucleotídicas específicas de gen generadas a partir de secuencias de miARN conocidas. La matriz puede contener dos sondas oligonucleotídicas diferentes para cada miARN, una que contiene la secuencia madura activa y la otra que es específica para el precursor del miARN. La matriz también puede contener controles, tales como una o más secuencias de ratón que difieren de ortólogos humanos en solamente algunas bases, que pueden actuar como controles para las condiciones de rigurosidad de hibridación. También pueden imprimirse ARNt u otros ARN (por ejemplo, ARNr, ARNm) de ambas especies en la microplaca, proporcionando un control positivo, relativamente estable, interno para hibridación específica. También pueden incluirse uno o más controles apropiados para hibridación específica en la microplaca. Para este fin, las secuencias se seleccionan basándose en la ausencia de cualquier homología con cualquier miARN conocido.

Las micromatrices pueden fabricarse usando técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, los oligonucleótidos sonda de la longitud apropiada, por ejemplo, de 40 nucleótidos, están modificados con amina 5' en la posición C6 y se imprimen usando sistemas de micromatrices disponibles en el mercado, por ejemplo, el GenuMachine OmniGrid™ 100 Microarrayer y portaobjetos activados por Amersham CodeLink™. El oligómero de ADNc marcado correspondiente a los ARN diana se prepara por transcripción inversa del ARN diana con cebador marcado. Después de la síntesis de primera cadena, los híbridos de ARN/ADN se desnaturalizan para degradar los moldes de ARN. Los ADNc diana marcados preparados de este modo se hibridan después en la microplaca de micromatrices

en condiciones de hibridación, por ejemplo, SSPE 6X/formamida al 30 % a 25 °C durante 18 horas, seguido de lavado en TNT 0,75X (Tris HCl/NaCl/Tween 20) a 37 °C durante 40 minutos. En posiciones en la matriz en las que el ADN sonda inmovilizado reconoce un ADNc diana complementario en la muestra se produce hibridación. El ADNc diana marcado marca la posición exacta en la matriz en la que se produce la unión, permitiendo detección y cuantificación automática. El resultado consiste en una lista de acontecimientos de hibridación, que indican la abundancia relativa de secuencias de ADNc específicas, y por tanto la abundancia relativa de los miR complementarios correspondientes en la muestra del paciente.

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

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

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

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

Más preferentemente, el perfil registrado incluye la intensidad de la señal de cada hibridación. El perfil se compara con el perfil de hibridación generado de una muestra de control normal, es decir, no cancerosa. Una alteración de la señal es indicativa de la presencia de, o propensión a desarrollar, cáncer en el sujeto.

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

También se proporcionan en el presente documento procedimientos para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de colon, que comprenden medir el nivel de al menos un producto génico de miR, que se asocia con un pronóstico particular en una enfermedad relacionada con cáncer de colon (por ejemplo, un pronóstico bueno o positivo, un pronóstico negativo o adverso), en una muestra de ensayo del sujeto.

De acuerdo con estos procedimientos, una alteración en el nivel de un producto génico de miR que está asociada con un pronóstico particular en la muestra de ensayo, en comparación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de que el sujeto tiene un cáncer sólido con un pronóstico particular. En una realización, el producto génico de miR está asociado con un pronóstico adverso (es decir, negativo). Los ejemplos de un pronóstico adverso incluyen, pero sin limitación, tasa de supervivencia baja y progresión de enfermedad rápida. En ciertas realizaciones, el nivel de al menos un producto génico de miR se mide mediante transcripción inversa de ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado de una muestra de control.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos de miR en las células puede dar como resultado la disregulación de una o más dianas pretendidas para estos miR, que puede conducir a la formación de cánceres sólidos. Por lo tanto, la alteración del nivel del producto génico de miR (por ejemplo, reducir el nivel de un producto génico de miR que está regulado positivamente en células de

cáncer sólido, aumentando el nivel de un producto génico de miR que está regulado negativamente en células de cáncer sólido) puede tratar exitosamente el cáncer sólido.

En consecuencia, se proporcionan adicionalmente en el presente documento procedimientos para inhibir la tumorigénesis en un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, un cáncer sólido en el que al menos un producto génico de miR está desregulado (por ejemplo, regulado negativamente, regulado positivamente) en las células cancerosas del sujeto. Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado negativamente en las células cancerosas (por ejemplo, miR-21), el procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz del al menos un producto génico de miR aislado, o una variante aislada o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo, de modo que se inhiba la proliferación de células cancerosas en el sujeto.

Por ejemplo, cuando un producto génico de miR está regulado negativamente en una célula cancerosa en un sujeto, administrar una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado al sujeto puede inhibir la proliferación de la célula cancerosa. El producto génico de miR aislado que se administra al sujeto puede ser idéntico al producto génico de miR natural endógeno (por ejemplo, un producto génico de miR) que está regulado negativamente en la célula cancerosa o puede ser una variante o fragmento biológicamente activo del mismo.

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

Como se define en el presente documento, un “fragmento biológicamente activo” de un producto génico de miR se refiere a un fragmento de ARN de un producto génico de miR que posee una o más actividades biológicas de un producto génico de miR natural correspondiente. Como se ha descrito anteriormente, los ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen pero sin limitación, inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana e inhibición de un proceso celular asociado con un cáncer de colon. En ciertas realizaciones, el fragmento biológicamente activo es de al menos aproximadamente 5, 7, 10, 12, 15 o 17 nucleótidos de longitud. En una realización particular, puede administrarse un producto génico de miR aislado a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos antineoplásicos adicionales. Los tratamientos antineoplásicos adecuados incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de los mismos (por ejemplo, quimiorradiación).

Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado positivamente en las células cancerosas, el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR, denominados en el presente documento compuestos de inhibición de la expresión génica de miR, de modo que se inhiba la proliferación de células de cáncer sólido. En una realización particular, el al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR es específico para un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

Puede administrarse un compuesto inhibidor de expresión génica de miR a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos antineoplásicos adicionales. Los tratamientos antineoplásicos adecuados incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de las mismas (por ejemplo, quimiorradiación).

Los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento”, como se usan en el presente documento, se refieren a aliviar síntomas asociados con una enfermedad o afección, por ejemplo, un cáncer sólido, incluyendo prevenir o retardar la aparición de los síntomas de enfermedad, y/o reducir la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad o afección. Los términos “sujeto”, “paciente” e “individuo” se definen en el presente documento que incluyen animales, tales como mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, primates, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, roedoras o murinas. En una realización preferida, el animal es un ser humano.

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

Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado puede basarse en el peso aproximado de una masa tumoral para tratar. El peso aproximado de una masa tumoral puede determinarse calculando el volumen

aproximado de la masa, siendo un centímetro cúbico de volumen aproximadamente equivalente a un gramo. Una cantidad eficaz del producto génico de miR aislado basado en el peso de un masa tumoral puede estar en el intervalo de aproximadamente 10-500 microgramos/gramo de masa tumoral. En ciertas realizaciones, la masa tumoral puede ser de al menos aproximadamente 10 microgramos/gramo de masa tumoral, al menos

5

aproximadamente 60 microgramos/gramo de masa tumoral o al menos aproximadamente 100 microgramos/gramo de masa tumoral.

Una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado también puede basarse en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto para tratar. Preferentemente, dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o por vía entérica, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se administra una cantidad eficaz del

10

producto génico de miR aislado a un sujeto que puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 3.000 microgramos/kg de peso corporal, de aproximadamente 700 - 1.000 microgramos/kg de peso corporal o de más de aproximadamente 1.000 microgramos/kg de peso corporal.

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

15

génico de miR al sujeto una vez (por ejemplo, como una única inyección o deposición). Como alternativa, un producto génico de miR puede administrarse una vez o dos veces al día a un sujeto durante un periodo de aproximadamente 3 a aproximadamente 28 días, más particularmente de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación particular, se administra un producto génico de miR una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende

20

que la cantidad eficaz del producto génico de miR administrado al sujeto puede comprender la cantidad total de producto génico administrado durante el régimen de dosificación completo.

Como se usa en el presente documento, un producto génico de miR "aislado" es uno que se sintetiza, o se altera o retira del estado natural mediante intervención humana. Por ejemplo, un producto génico de miR sintético, o un producto génico de miR parcialmente o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado

25

natural, se considera que está "aislado". Un producto génico de miR aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en una célula en la que se ha suministrado el producto génico de miR. Por lo tanto, un producto génico de miR que se suministra deliberadamente a, o se expresa en, una célula se considera un producto génico de miR "aislado". También se considera que un producto génico de miR producido dentro de una célula de una molécula precursora de miR es una molécula "aislada". De acuerdo con una realización particular, los productos

30

génicos de miR aislados descritos en el presente documento pueden usarse para la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer sólido en un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

Pueden obtenerse productos génicos de miR aislados usando varias técnicas convencionales. Por ejemplo, los productos génicos de miR pueden sintetizarse químicamente o producirse de forma recombinante usando

35

procedimientos conocidos en la técnica. En una realización, se sintetizan químicamente productos génicos de miR usando ribonucleósido fosforamiditas protegidas de forma apropiada y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Los proveedores comerciales de moléculas de ARN sintéticas o reactivos de síntesis incluyen, por ejemplo, Prologo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, Estados Unidos), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, Estados Unidos), Glen Research (Sterling, VA, Estados Unidos), ChemGenes (Ashland, MA, Estados Unidos) y Cruachem (Glasgow, Reino Unido).

Como alternativa, los productos génicos de miR pueden expresarse de plásmidos de ADN lineales o circulares recombinantes usando cualquier promotor adecuado. Los promotores adecuados para expresar ARN de un plásmido incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras de ARN pol III U6 o H1, o los promotores de citomegalovirus. La selección de los promotores adecuados está dentro de la experiencia de la técnica. Los plásmidos recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para

40

expresión de los productos génicos de miR en células cancerosas.

45

Los productos génicos de miR que se expresan de plásmidos recombinantes pueden aislarse de sistemas de expresión celular cultivados por técnicas convencionales. Los productos génicos de miR que se expresan de plásmidos recombinantes también pueden suministrarse a, y expresarse directamente en, las células cancerosas. El uso de plásmidos recombinantes para suministrar los productos génicos de miR a células cancerosas se analiza en

50

más detalle más adelante.

Los productos génicos de miR pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante separado o pueden expresarse a partir del mismo plásmido recombinante. En una realización, los productos génicos de miR se expresan como moléculas precursoras de ARN de un único plásmido, y las moléculas precursoras se procesan en el

55

producto génico de miR funcional mediante un sistema de procesamiento adecuado, incluyendo, pero sin limitación, sistemas de procesamiento existentes dentro de una célula cancerosa. Otros sistemas de procesamiento adecuados incluyen, por ejemplo, el sistema de lisado celular de *Drosophila in vitro* (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos Nº 2002/0086356 de Tuschl y col. y el sistema de RNasa III de *E. coli* (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos Nº 2004/0014113 de Yang y col).

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

En una realización, un plásmido que expresa los productos génicos de miR comprende una secuencia que codifica un ARN precursor de miR bajo el control del promotor intermedio-temprano de CMV. Como se usa en el presente documento, "bajo el control" de un promotor significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican el producto génico de miR se localizan en 3' del promotor, de modo que el promotor puede iniciar la transcripción de las secuencias codificantes del producto génico de miR.

Los productos génicos de miR también pueden expresarse de vectores virales recombinantes. Se contempla que los productos génicos de miR pueden expresarse de dos vectores virales recombinantes separados o del mismo vector viral. El ARN expresado de los vectores virales recombinantes puede aislarse de sistemas de expresión de células cultivadas por técnicas convencionales o puede expresarse directamente en células cancerosas. El uso de vectores virales recombinantes para suministrar los productos génicos de miR a células cancerosas se analiza en más detalle posteriormente.

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

Puede usarse cualquier vector viral capaz de aceptar las secuencias codificantes para los productos génicos de miR; por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (AV); virus adeno-asociados (AAV); retrovirus (por ejemplo lentivirus (LV), Rhabdovirus, virus de leucemia murina); virus del herpes y similares. El tropismo de los vectores virales puede modificarse por pseudotipación de los vectores con proteínas de envoltura u otros antígenos superficiales de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de cápsida viral según sea apropiado.

Por ejemplo, los vectores lentivirales de la invención pueden pseudotiparse con proteínas superficiales de virus de estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola y similares. Los vectores AAV de la invención pueden realizarse para dirigirse a células diferentes modificando por ingeniería genética los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de la cápsida. Por ejemplo, un vector AAV que exprese una cápsida de serotipo 2 en un genoma de serotipo 2 se llama AAV 2/2. Este gen de cápsida de serotipo 2 en el vector AAV 2/2 puede reemplazarse por un gen de cápsida de serotipo 5 para producir un vector AAV 2/5. Las técnicas para construir vectores AAV que expresan diferentes serotipos de proteínas de cápsida están dentro de la experiencia de la técnica; véase, por ejemplo, Rabinowitz, J.E., y col. (2002), *J. Virol.* 76: 791-801.

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

Son vectores virales particularmente adecuados los derivados de AV y AAV. Un vector AV adecuado para expresar los productos génicos de miR, un procedimiento para construir el vector AV recombinante y un procedimiento para suministrar el vector a células diana, se describen en Xia y col. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010. Se describen vectores AAV adecuados para expresar los productos génicos de miR, procedimientos para construir el vector AAV recombinante y procedimientos para suministrar los vectores a células diana en Samulski y col. (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher y col. (1996), *J. Virol.*, 70: 520-532; Samulski y col. (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; Patente de Estados Unidos Nº 5.252.479; Patente de Estados Unidos Nº 5.139,941; Solicitud de Patente Internacional Nº WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional Nº WO 93/24641. En una realización, los productos génicos de miR se expresan de un único vector AAV recombinante que comprende el promotor temprano intermedio de CMV.

En una cierta realización, un vector viral AAV recombinante de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN precursor de miR en conexión operable con una secuencia de terminación poliT bajo el control de un promotor de ARN U6 humano. Como se usa en el presente documento, "en conexión operable con una secuencia de terminación poliT" significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas sentido y antisentido están inmediatamente adyacentes a la señal de terminación poliT en la dirección 5'. Durante la transcripción de las secuencias de miR del vector, las señales de terminación poliT actúan para terminar la transcripción.

En otra realización de los procedimientos de tratamiento de la invención, puede administrarse al sujeto una cantidad

eficaz de al menos un compuesto que inhibe la expresión de miR. Como se usa en el presente documento, “inhibir la expresión de miR” significa que la producción del precursor y/o forma madura activa del producto génico de miR después de tratamiento es menor que la cantidad producida antes del tratamiento. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si la expresión de miR se ha inhibido en una célula cancerosa, usando, por ejemplo, las técnicas para determinar el nivel de transcrito de miR analizado anteriormente para el procedimiento de diagnóstico. Puede producirse inhibición al nivel de expresión génica (es decir, inhibiendo la transcripción de un gen de miR que codifica el producto génico de miR) o al nivel de procesamiento (por ejemplo, inhibiendo el procesamiento de un precursor de miR en un miR maduro activo).

Como se usa en el presente documento, un “cantidad eficaz” de un compuesto que inhibe la expresión de miR es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto que padece cáncer (por ejemplo, un cáncer de colon). Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un compuesto de inhibición de la expresión de miR para administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores tales como la talla y peso del sujeto; el grado de penetración de enfermedad; la edad, salud y sexo del sujeto; la vía de administración; y si la administración es regional o sistémica.

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

Un experto en la materia también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para administrar un compuesto que inhibe la expresión de miR a un sujeto dado.

Los compuestos adecuados para inhibir la expresión génica de miR incluyen ARN bicatenario (tal como ARN de interferencia pequeño o corto o “ARNip”), ácidos nucleicos antisentido y moléculas de ARN enzimáticas, tales como ribozimas. Cada uno de estos compuestos puede dirigirse a un producto génico de miR dado e interferir con la expresión (por ejemplo, inhibir la traducción de, inducir la escisión o destrucción de) el producto génico de miR diana.

Por ejemplo la expresión de un gen de miR dado puede inhibirse induciendo la interferencia de ARN del gen de miR con una molécula de ARN bicatenario (“ARNbc”) aislada que tiene al menos el 90 %, por ejemplo al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o 100 % de homología de secuencia con al menos una parte del producto génico de miR. En una realización particular, la molécula de ARNbc es un “ARN de interferencia corto o pequeño” o “ARNip”.

Los ARNip útiles en los presentes procedimientos comprenden ARN bicatenario corto de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El ARNip comprende una cadena de ARN sentido y una cadena de ARN antisentido complementaria hibridadas entre sí mediante interacciones de formaciones de pares de bases de Watson-Crick convencionales (en lo sucesivo en el presente documento “con pares de bases”). La cadena sentido comprende una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a una secuencia de ácido nucleico contenida dentro del producto génico de miR diana.

Como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico en un ARNip que es “sustancialmente idéntica” a una secuencia diana contenida dentro del ARNm diana es una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia diana, o que difiere de la secuencia diana en uno o dos nucleótidos. Las cadenas sentido y antisentido del ARNip pueden comprender dos moléculas de ARN monocatenarias complementarias, o pueden comprender una única molécula en la que dos partes complementarias tienen pares de bases y están ligadas covalentemente por un área en “horquilla” monocatenaria.

El ARNip también puede ser ARN alterado que difiere de ARN de origen natural mediante la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como el extremo o los extremos del ARNip o a uno o más nucleótidos internos del ARNip o modificaciones que hacen al ARNip resistente a digestión por nucleasas, o la sustitución de uno o más nucleótidos en el ARNip con desoxirribonucleótidos.

Una o ambas cadenas del ARNip también pueden comprender un saliente 3'. Como se usa en el presente documento un “saliente 3'” se refiere a al menos un nucleótido desparejado que se extiende desde el extremo 3' de una cadena de ARN bicatenaria. Por tanto, en ciertas realizaciones, el ARNip comprende al menos un saliente 3' de uno a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) de longitud, de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En una realización particular, el saliente 3' está presente en ambas cadenas del ARNip y es de 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena del ARNip puede comprender salientes 3' de ácido ditimidílico (“TT”) o ácido diuridílico (“uu”).

El ARNip puede producirse de forma química o biológica, o puede expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos de miR aislados. Se describen

procedimientos ejemplares para producir y ensayar moléculas de ARN_{bc} o ARN_{ip} en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2002/0173478 de Gewirtz y en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2004/0018176 de Reich y col.

- La expresión de un gen de miR dado también puede inhibirse por un ácido nucleico antisentido. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une a ARN diana por medio de interacciones ARN-ARN, ARN-ADN o ADN-ácido péptido nucleico, que altera la actividad del ARN diana. Son ácidos nucleicos antisentido adecuados para su uso en los presentes procedimientos los ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo ARN, ADN, quimeras de ARN-ADN, ácido péptido nucleico (PNA)) que generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico complementaria de una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. El ácido nucleico antisentido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es el 50-100 % complementaria, el 75-100 % complementaria o el 95-100 % complementaria de una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR.
- Sin desear quedar ligado por ninguna teoría, se cree que los ácidos nucleicos antisentido activan la RNasa H u otra nucleasa celular que digiere el producto génico de miR/doble cadena de ácido nucleico antisentido.
- Los ácidos nucleicos antisentido también pueden contener modificaciones de la cadena principal de ácido nucleico o de los restos de azúcar y base (o sus equivalentes) para potenciar la especificidad diana, resistencia a nucleasa, suministro u otras propiedades relacionadas con la eficacia de la molécula. Dichas modificaciones incluyen restos de colesterol, intercaladores bicatenarios, tales como acridina, o uno o más grupos resistentes a nucleasa.
- Pueden producirse ácidos nucleicos antisentido química o biológicamente, o pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos de miR aislados. Los procedimientos para producir y ensayar están dentro de la experiencia de la técnica; véase, por ejemplo, Stein y Cheng (1993), Science 261: 1004 y Patente de Estados Unidos N° 5.849.902 de Woolf y col., las divulgaciones completas de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia.
- La expresión de un gen de miR dado también puede inhibirse por un ácido nucleico enzimático. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico enzimático" se refiere a un ácido nucleico que comprende una región de unión a sustrato que tiene complementariedad con una secuencia de ácido nucleico contigua de un producto génico de miR, y que es capaz de escindir específicamente el producto génico de miR. La región de unión del sustrato a ácido nucleico enzimático puede ser, por ejemplo, 50-100 % complementario, 75-100 % complementario, o 95-100 % complementario de una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. Los ácidos nucleicos enzimáticos también pueden comprender modificaciones en la base, azúcar y/o grupos fosfato. Un ácido nucleico enzimático ejemplar para su uso en los presentes procedimientos es una ribozima.
- Los ácidos nucleicos enzimáticos pueden producirse química o biológicamente, o pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos de miR aislados. Se describen procedimientos ejemplares para producir y ensayar moléculas de ARN_{bc} o ARN_{ip} en Werner y Uhlenbeck (1995), Nucl. Acids Res. 23: 2092-96; Hammann y col. (1999), Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 9: 25-31; y Patente de Estados Unidos N° 4.987.071 de Cech y col.
- La administración de al menos un producto génico de miR, o al menos un compuesto para inhibir la expresión de miR, inhibirá la proliferación de células cancerosas en un sujeto que tenga un cáncer sólido. Como se usa en el presente documento, "inhibir la proliferación de una célula cancerosa" significa destruir la célula, o detener o ralentizar permanente o temporalmente el crecimiento de la célula. Puede inferirse la inhibición de la proliferación de células cancerosas si el número de dichas células en el sujeto sigue siendo constante o se reduce después de la administración de los productos génicos de miR, o compuestos de inhibición de la expresión del gen de miR. También puede inferirse una inhibición de la proliferación de células cancerosas si el número absoluto de dichas células aumenta, pero la velocidad de crecimiento tumoral se reduce.
- El número de células cancerosas en el cuerpo de un sujeto puede determinarse por medición directa, o por estimación del tamaño de masas tumorales primarias o metastásicas. Por ejemplo, el número de células cancerosas en un sujeto puede medirse por procedimientos inmunohistológicos, citometría de flujo, u otras técnicas diseñadas para detectar marcadores de superficie característicos de células cancerosas.
- El tamaño de una masa tumoral puede determinarse mediante información visual directa, o mediante procedimientos de captura de imágenes de diagnóstico, tales como rayos X, imágenes por resonancia magnética, ultrasonidos y escintigrafía. Pueden usarse procedimientos de captura de imágenes de diagnóstico para determinar el tamaño de la masa tumoral con o sin agentes de contraste, como se conoce en la técnica. El tamaño de una masa tumoral también puede determinarse mediante medios físicos, tales como palpación de la masa tisular o medición de la masa tisular con un instrumento de medición, tal como un calibrador.
- Los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión del gen de miR pueden administrarse a un sujeto por cualquier medio adecuado para suministrar estos compuestos a células cancerosas del sujeto. Por ejemplo, los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión de miR pueden administrarse por procedimiento adecuados para transfectar células del sujeto con estos compuestos, o con ácidos nucleicos que

comprenden secuencias que codifican estos compuestos.

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

Se conocen bien en la técnica procedimientos de transfección para células eucariotas, e incluyen, por ejemplo, inyección directa del ácido nucleico en el núcleo o pronúcleo de una célula; electroporación; transferencia de liposomas o transferencia mediada por materiales lipófilos; suministro de ácido nucleico mediado por receptor, biobalística o aceleración de partículas; precipitación de fosfato cálcico y transfección mediada por vectores virales.

Por ejemplo, las células pueden transfectarse con un compuesto de transferencia liposómica, por ejemplo, DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio metilsulfato, Boehringer-Mannheim) o un equivalente, tal como LIPOFECTINA. La cantidad de ácido nucleico usado no es crítica para la práctica de la invención; pueden conseguirse resultados aceptables con 0,1-100 microgramos de ácido nucleico/10⁵ células. Por ejemplo, puede usarse una relación de aproximadamente 0,5 microgramos de vector plasmídico en 3 microgramos de DOTAP por cada 10⁵ células.

También puede administrarse un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión de gen de miR a un sujeto por cualquier vía de administración entérica o parenteral adecuada. Las vías de administración entéricas adecuadas para los presentes procedimientos incluyen, por ejemplo, suministro oral, rectal o intranasal. Las vías de administración parenteral adecuadas incluyen, por ejemplo, administración intravascular (por ejemplo, inyección de embolada intravenosa, infusión intravenosa, inyección de embolada intraarterial, infusión intraarterial e instilación con catéter en la vasculatura); inyección peri e intratistular (por ejemplo, inyección peritumoral e intratumoral, inyección intrarretinal o inyección subretinal); inyección o deposición subcutánea, incluyendo infusión subcutánea (tal como por bombas osmóticas); aplicación directa al tejido de interés, por ejemplo mediante un catéter u otro dispositivo de colocación (por ejemplo, un sedimento retinal o supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso); e inhalación. Son vías de administración particularmente adecuadas inyección, infusión e inyección directa en el tumor.

En los presentes procedimientos, puede administrarse un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión de producto génico de miR al sujeto como ARN desnudo, en combinación con un reactivo de suministro, o como un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido recombinante o vector viral) que comprende secuencias que expresan el producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión de producto génico de miR. Los reactivos de suministro adecuados incluyen, por ejemplo, el reactivo lipófilo Mirus Transit TKO; lipofectina; lipofectamina; celfectina; policationes (por ejemplo, polilisina) y liposomas.

Se analizan en el presente documento y/o se conocen bien en la técnica plásmidos recombinantes y vectores virales que comprenden secuencias que expresan los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión génica de miR, y técnicas para suministrar dichos plásmidos y vectores a células cancerosas.

En una realización particular, se usan liposomas para suministrar un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a un sujeto. Los liposomas también pueden aumentar la semi-vida en sangre de los productos génicos o ácidos nucleicos. Pueden formarse liposomas adecuados para su uso en la invención a partir de lípidos formadores de vesículas convencionales, que incluye generalmente fosfolípidos cargados negativamente o neutros y un esteroide, tal como colesterol. La selección de lípidos se guía generalmente por consideración de factores, tales como el tamaño del liposoma deseado y la semi-vida de los liposomas en el torrente sanguíneo. Se conoce una diversidad de procedimientos para preparar liposomas, por ejemplo, como se describe en Szoka y col. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467; y Patentes de Estados Unidos N° 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Los liposomas para su uso en los presentes procedimientos pueden comprender una molécula ligando que dirige liposoma a células cancerosas. Se prefieren ligandos que se unan a receptores prevalentes en células cancerosas, tales como anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos celulares tumorales.

Los liposomas para su uso en los presentes procedimientos también pueden modificarse para evitar la eliminación por el sistema de macrófago mononuclear ("MMS") y sistema retículo endotelial ("RES"). Dichos liposomas modificados tienen restos de inhibición de opsonización en la superficie o incorporados en la estructura del liposoma. En una realización particularmente preferida, un liposoma de la invención puede comprender tanto un resto de inhibición de opsonización como un ligando.

Los restos de inhibición de la opsonización para su uso en la preparación de los liposomas de la invención son normalmente polímeros hidrófilos grandes que se unen a la membrana de liposoma. Como se usa en el presente documento, un resto de inhibición de opsonización está "unido" a una membrana de liposoma cuando está unido química o físicamente unido a la membrana, por ejemplo, mediante la intercalación de un anclaje soluble en lípidos en la membrana en sí misma, o mediante unión directamente con grupos activos de lípidos de membrana. Estos polímeros hidrófilos inhibidores de opsonización forman una capa de superficie protectora que reduce significativamente la captación de los liposomas por el MMS y RES; por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.920.016.

Los restos de inhibición de opsonización adecuados para modificar liposomas son preferentemente polímeros solubles en agua con un peso molecular medio en número de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 dalton y más preferentemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 dalton. Dichos polímeros incluyen derivados de polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG); por ejemplo, metoxi PEG o PPG y estearato de PEG o PPG; polímeros sintéticos, tales como poli(acrilamida o poli N-vinil pirrolidona); poliamidoaminas lineales, ramificadas o dendríméricas; ácidos poli(acrílicos); polialcoholes, por ejemplo, polivinilalcohol y polixilitol con los que se ligan químicamente grupos carboxílicos o amino, así como gangliósidos, tales como gangliósido GM1. También son adecuados copolímeros de PEG, metoxi PEG o metoxi PPG o derivados de los mismos. Además, el polímero inhibidor de opsonización puede ser un copolímero en bloque de PEG y un poliamino ácido, polisacárido, poliamidoamina, polietilenamina o polinucleótido. Los polímeros inhibidores de opsonización también pueden ser polisacáridos naturales que contengan aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péctico, ácido neuramínico, ácido algínico, carragenina; polisacáridos u oligosacáridos aminados (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por ejemplo, que reaccionan con derivados de ácidos carbónicos con enlace resultante de grupos carboxílicos. Preferentemente, el resto inhibidor de opsonización es un PEG, PPG, o un derivado de los mismos. Los liposomas modificados con PEG o derivados de PEG se denominan en ocasiones "liposomas pegilados".

El resto de inhibición de opsonización puede unirse a la membrana del liposoma por una cualquiera de numerosas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, N-hidroxisuccinimida éster de PEG puede unirse a un anclaje soluble en lípidos de fosfatidil-etanolamina y después unirse a una membrana. De forma similar, un polímero de dextrano puede derivatizarse con un anclaje soluble en lípidos de estearil amina mediante aminación reductora usando $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ y una mezcla de disolvente, tal como tetrahidrofurano y agua en una relación 30:12 a 60 °C.

Los liposomas modificados con restos de inhibición de opsonización permanecen en circulación mucho más tiempo que los liposomas no modificados. Por esta razón, dichos liposomas se denominan en ocasiones liposomas "sigilosos". Se sabe que los liposomas sigilosos se acumulan en tejidos alimentados por microvasculatura porosa o "filtrante". Por lo tanto, el tejido caracterizado por dichos defectos de microvasculatura, por ejemplo, tumores sólidos, acumulará eficazmente estos liposomas; véase Gabizon, y col. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18: 6949-53. Además, la captación reducida por el RES reduce la toxicidad de liposomas sigilosos evitando la acumulación significativa de los liposomas en el hígado y el bazo. Por lo tanto, los liposomas que están modificados con restos inhibidores de opsonización son particularmente adecuados para suministrar los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión génica de miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a células tumorales.

Los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión génica de miR pueden formularse como composiciones farmacéuticas, en ocasiones denominadas "medicamentos" antes de administrarlos a un sujeto, de acuerdo con técnicas conocidas en este campo. En consecuencia, la invención abarca composiciones farmacéuticas para tratar un cáncer sólido. En una realización, la composición farmacéutica comprende al menos un producto génico de miR aislado, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el al menos un producto génico de miR corresponde a un producto génico de miR que tiene un nivel reducido de expresión en células cancerosas sólidas en relación con células de control adecuadas. En ciertas realizaciones, el producto génico de miR aislado se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR. En una realización particular, el al menos un compuesto de inhibición de la expresión génica de miR es específico para un gen miR cuya expresión es mayor en células de cáncer de colon que en células de control. En ciertas realizaciones, el compuesto inhibidor de expresión génica de miR es específico para uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se caracterizan por ser al menos estériles y sin pirógenos. Como se usa en el presente documento, "composiciones farmacéuticas" incluye formulaciones para uso humano y veterinario. Están dentro de la experiencia de la técnica procedimientos para preparar composiciones farmacéuticas de la invención, por ejemplo como se describe en Remington's Pharmaceutical Science, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985).

Las presentes composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) (por ejemplo, del 0,1 al 90 % en peso), o una sal fisiológicamente aceptable de los mismos, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden adicionalmente uno o más agentes antineoplásicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos). Las formulaciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender al menos un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican), que se encapsulan por liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende un gen de miR o producto génico que es miR-21.

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

5 En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) que es resistente a degradación por nucleasas. Un experto en la materia puede sintetizar fácilmente ácidos nucleicos que son resistentes a nucleasas, por ejemplo incorporando uno o más ribonucleótidos que se modifican en la posición 2' en el producto génico de miR. Los ribonucleótidos modificados 2' adecuados incluyen los modificados en la posición 2' con fluoro, amino, alquilo, alcoxi y O-alilo.

10 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizadores, antioxidantes, agentes de ajuste de osmolaridad, tampones y agentes de ajustes de pH. Los aditivos adecuados incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente biocompatibles (por ejemplo, clorhidrato de trometamina), adiciones de quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos de quelados de calcio (tales como, por ejemplo, DTPA cálcico, CaNaDTPA-bisamida) o, opcionalmente, adiciones de sales de calcio o sodio (por ejemplo cloruro cálcico, ascorbato cálcico, gluconato cálcico o lactato cálcico). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden envasarse para su uso en forma líquida, o pueden liofilizarse.

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

20 Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida para administración oral puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes enumerados anteriormente y el 10-95 %, preferentemente el 25-75 % del al menos un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican). Una composición farmacéutica para administración por aerosol (por inhalación) puede comprender el 0,01-20 % en peso, preferentemente el 1 %-10 % en peso, del al menos un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) encapsulado en un liposoma como se ha descrito anteriormente, y un propulsor. También puede incluirse un vehículo según se desee; por ejemplo, lecitina para suministro intranasal.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además uno o más agentes antineoplásicos. En una realización particular, las composiciones comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) y al menos un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que son adecuados para los procedimientos de la invención incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes de ADN, agentes antibióticos antitumorales, agentes anti-metabólicos, agentes estabilizadores de tubulina, agentes desestabilizadores de tubulina, agentes antagonistas hormonales, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de proteína quinasa, inhibidores de HMG-CoA, inhibidores de CDK, inhibidores de ciclina, inhibidores de caspasa, inhibidores de metaloproteinasas, ácidos nucleicos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ácidos nucleicos, y agentes virales, bacterianos y exotóxicos modificados molecularmente. Los ejemplos de agentes adecuados para las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, citidina arabinósido, metotrexato, vincristina, etopósido (VP-16), doxorubicina (adriamicina), cisplatino (CDDP), dexametasona, arglabin, ciclofosfamida, sarcolisina, metilnitrosourea, 40 fluorouracilo, 5-fluorouracilo (5FU), vinblastina, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, oxaliplatino, irinotecan, topotecan, leucovorina, carmustina, estreptozocina, CPT-11, taxol, tamoxifeno, dacarbazina, rituximab, daunorubicina, 1-β -D-arabinofuranosilcitosina, imatinib, fludarabina, docetaxel, FOLFOX4.

45 También se proporcionan en el presente documento procedimientos para identificar un inhibidor de tumorigénesis, que comprenden proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR en la célula. En una realización, el procedimiento comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión reducidos en células cancerosas. Un aumento del nivel del producto génico de miR en la célula después de que se proporcione el agente, en relación con una célula de control adecuada (por ejemplo, no se proporciona agente), es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de tumorigénesis. En una realización particular, al menos un producto génico de 50 miR asociado con niveles de expresión reducidos en células cancerosas se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

55 En otras realizaciones, el procedimiento comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión aumentados en células cancerosas. Una reducción en el nivel del producto génico de miR en la célula después de que se proporcione el agente, en relación con una célula de control adecuada (por ejemplo, no se proporciona agente), es indicativa de que el agente de ensayo es un inhibidor de tumorigénesis. En una realización particular, al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión aumentados en células cancerosas se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

Los agentes adecuados incluyen, pero sin limitación, fármacos (por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos), y

macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos). El agente puede producirse de forma recombinante, sintética o puede aislarse (es decir, purificarse) de una fuente natural. Se conocen bien en la técnica diversos procedimientos para proporcionar dichos agentes a una célula (por ejemplo, transfección), y se han descrito anteriormente en el presente documento varios de dichos procedimientos. También se conocen bien en la técnica procedimientos para detectar la expresión de al menos un producto génico de miR (por ejemplo transferencia de Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR, perfiles de expresión). Varios de estos procedimientos también se han descrito anteriormente en el presente documento.

La invención se ilustrará ahora por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Se alteran patrones de expresión de microARN en tumores de control

Los inventores compararon perfiles de microARN de 84 pares de tejidos tumorales de colon y no tumorales adyacentes usando micromatrices de microARN³⁰. Estos 84 sujetos fueron pacientes reclutados del área metropolitana de Baltimore, Maryland, con adenocarcinoma de colon incidente y se denomina la cohorte de ensayo de Maryland (**Tabla 1**).

Tabla 1- Características de población y tumores

	Cohorte de ensayo de Maryland	Cohorte de validación de Hong Kong
	N=84	N=113
Área de reclutamiento	Baltimore, Maryland, Estados Unidos	Hong Kong, China
Edad en el momento de admisión-años		
Media ± DT	64,6 ± 10,7	55,8 ± 15
Intervalo	32-87	32-84
Sexo - Nº (%)		
Hombre	66 (79)	56 (50)
Mujer	18 (21)	57 (50)
Raza - Nº (%)		
Blanco	52 (62)	0 (0)
Negro	32 (38)	0 (0)
Asiático	0 (0)	113 (100)
Localización del tumor - Nº (%)		
Distal	48 (59)	90 (80)
Proximal	34 (41)	23 (20)
Histología de adenocarcinoma - Nº (%) Adenocarcinoma	75 (89)	105 (93)
Adenocarcinoma mucinoso	8 (10)	7 (6)
Carcinoma Adenoescamoso	1 (1)	0 (0)
Célula de anillo de sello y mucinoso	0 (0)	1 (1)
Quimioterapia adyuvante ² - Nº (%) Recibido	22 (37)	40 (35)
No recibió	37 (63)	73 (65)
Estadio TNM – Nº (%)		
II	29 (34)	37 (33)
III	36 (43)	48 (42)
IV	10 (12)	19 (17)

¹Distal incluye tumores localizados en o distantes al colon descendiente. Los tumores proximales incluyen tumores en o próximos a la flexura esplénica. La localización del tumor estuvo disponible para 82 sujetos en la cohorte original y todos los sujetos en la cohorte de validación. ²Estaba disponible información detallada que concierne a la recepción de quimioterapia para 59 sujetos en la cohorte de ensayo y todos los sujetos en la cohorte de validación.

La quimioterapia fue principalmente basada en fluorouracilo (en formas de 5-fluorouracilo intravenosas o fármacos orales incluyendo tegafur con uracilo [UFT]) con o sin Levamisol o Leucovorina.

Los perfiles de microARN tumorales eran claramente diferentes de perfiles no tumorales. Se descubrió que 37 microARN independientes estaban expresados diferencialmente en tumores ($p < 0,001$ con tasa de descubrimiento falso $< 0,5\%$); **Tabla 2**.

5

Tabla 2 - MicroARN que se expresan diferencialmente en tumores

Sonda	miR maduro	p-valor ¹	FDR ²	Factor de cambio	Localización cromosómica
hsa-mir-21No1	miR-21	$< 1e-07$	$< 1e-07$	1,7	17q23.2
hsa-mir-021-prec-17No1	miR-21	$< 1e-07$	$< 1e-07$	1,8	17q23.2
hsa-mir-092-prec-13=092-1No2	miR-92	$< 1e-07$	$< 1e-07$	1,4	13q31.3
hsa-mir-222-precNo2	miR-222	1,40E-06	8,05E-05	1,2	Xp11.3
hsa-mir-181b-2No1	miR-181b	1,90E-06	8,74E-05	1,2	9q33.3
hsa-mir-210-prec	miR-210	1,12E-05	0,00032	1,2	11p15.5
hsa-mir-020-prec	miR-20a	2,53E-05	0,00057	1,5	13q31.3
hsa-mir-106-prec-X	miR-106a	3,30E-05	0,00058	1,4	X26.2
hsa-mir-106aNo1	miR-106a	3,51E-05	0,00058	1,4	X26.2
hsa-mir-093-prec-7.1=093-1	miR-93	3,52E-05	0,00058	1,2	7q22.1
hsa-mir-335No2	miR-335	3,55E-05	0,00058	1,2	7q32.2
hsa-mir-222-precNo1	miR-222	4,27E-05	0,00065	1,2	Xp11.3
hsa-mir-338No1	miR-338	5,78E-05	0,00074	1,1	17q25.3
hsa-mir-133bNo2	miR-133b	6,50E-05	0,00079	1,1	6p12.2
hsa-mir-092-prec-X=092-2	miR-92	7,95E-05	0,00083	1,4	Xq26.2
hsa-mir-346No1	miR-346	8,42E-05	0,00084	1,2	10q23.2
hsa-mir-106bNo1	miR-106b	0,0002091	0,00178	1,2	7q22.1
hsa-mir-135-2-prec	miR-153a	0,0002363	0,00194	1,1	12q23.1
hsa-mir-219-1No2	miR-219	0,0002515	0,00199	1,3	9q34.11
hsa-mir-34aNo1	miR-34a	0,000265	0,00203	1,1	1p36.22
hsa-mir-099b-prec-19No1	miR-99b	0,0003758	0,00259	1,1	19q13.41
hsa-mir-185-precNo2	miR-185	0,0003827	0,00259	1,2	22q11.21
hsa-mir-223-prec	miR-223	0,0004038	0,00265	1,4	Xq12
hsa-mir-211-precNo2	miR-211	0,0004338	0,00277	1,1	15q13.3
hsa-mir-135-1-prec	miR-135a	0,0004648	0,00287	1,1	3p21.1
hsa-mir-127-prec	miR-127	0,0004748	0,00287	1,1	14q32.31
hsa-mir-203-precNo1	miR-203	0,0009933	0,00294	1,4	14q32.33
hsa-mir-212-precNo1	miR-212	0,0006339	0,00364	1,1	17p13.3

hsa-mir-095-prec-4	miR-95	0,0006996	0,00392	1,2	4p16.1
hsa-mir-017-precNo2	miR-17-5p	0,0007252	0,00392	1,3	13q31.3
microARN con expresión reducida en tumores					
Sonda	miR maduro	p-valor ¹	FDR ²	Factor de cambio	Localización cromosómica
hsa-mir-342No2	miR-342	4,00E-06	0,0005	0,9	14q32.2
hsa-mir-192-2/3No1	miR-192	8,70E-06	0,00029	0,7	11q13.1
hsa-mir-1-2No2	miR-1	2,22E-05	0,00057	0,9	18g11.2
hsa-mir-34bNo2	miR-34b	4,78E-05	0,00069	0,8	11q23.1
hsa-mir-215-precNo1	miR-215	5,26E-05	0,00071	0,7	1q41
hsa-mir-192No1	miR-192	7,36E-05	0,00081	0,7	11q13.1
hsa-mir-301 No2	miR-301	7,44E-05	0,00081	0,7	17q23.2
hsa-miR-324-5pNo2	miR-324-5p	1,00E-04	0,00096	0,9	17p13.1
hsa-mir-030a-precNo2	miR-30a-3p	0,0001933	0,00171	0,9	6q13
hsa-mir-1-1 No2	miR-1	0,0002906	0,00216	0,9	20q13.33
hsa-mir-34cNo2	miR-34c	0,0007334	0,00392	0,9	11q23.1
hsa-mir-331 No2	miR-331	0,0008555	0,00446	0,9	12q22
hsa-mir-148bNo2	miR-148b	0,0008726	0,00446	0,9	12q13.13
Los p-valores presentados son el resultado de análisis de comparación de clases emparejadas de patrones de expresión de microARN de 84 pares de adenocarcinomas de colon y tejido no tumoral. ² FDR = tasa de falso descubrimiento					

Se expresaron 26 microARN a mayores niveles en tumores con miR21 enriquecido más a 1,8 veces. Los perfiles de microARN globales distinguen entre tejido tumoral y no tumoral emparejado con 89 % de precisión usando los algoritmos de predicción de clase de centroide más cercano o los 3 vecinos más cercanos (validación cruzada de 10 veces repetida 100 veces), lo que sugiere un cambio sistemático en los patrones de expresión de microARN durante la formación del tumor.

Los inventores seleccionaron miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b y miR-203 para validación basándose en sus diferencias de expresión entre tejido tumoral y no tumoral emparejado combinado con su asociación con escasa supervivencia. Para la validación, los inventores midieron los niveles de expresión de estos microARN con qRT-PCR en tejido tumoral y no tumoral emparejado de una cohorte independiente. La cohorte de validación consiste en 113 pacientes reclutados de Hong Kong, China con cáncer de colon incidente (Tabla 1).

MiR-20a (2,3-veces), miR-21 (2,8-veces), miR106a (2,4-veces), miR-18 1b (1,4-veces) y miR-203 (1,8-veces) se expresaron todos a mayores niveles en tumores (p<0,001, ensayo de pares emparejados de Wilcoxon) (**Tabla 3a**).

Tabla 3 - Expresión de microARN en tumores frente a tejido no tumoral emparejado

Tabla 3a - La cohorte de validación de Hong Kong

			Factor de cambio	
MicroARN	$\Delta\Delta Ct^1$	DT ($\Delta\Delta Ct$)	tumores ²	p - valor ³
miR-20a	1,18	0,97	2,3 veces	p<0,001
miR-21	1,47	1,20	2,8 veces	p<0,001
miR-106a	1,25	0,94	2,4 veces	p<0,001

miR-181 b	0,47	1,03	1,4 veces	p<0,001
miR-203	0,83	1,40	1,8 veces	p<0,001

Tabla 3b Expresión de microARN en adenoma frente a tejido de no adenoma emparejado

	Media		Factor de cambio	
MicroARN	$\Delta\Delta$ Ct ¹	SD ($\Delta\Delta$ Ct)	adenomas ²	p - valor ³
miR-20a	-0,11	0,97	0,9 veces	p = 0,82
miR-21	0,64	0,90	1,6 veces	p = 0,006
miR-106a	0,28	1,22	1,2 veces	p = 0,19
miR-181 b	0,30	1,24	1,2 veces	p = 0,27
miR-203	0,77	1,98	1,7 veces	p = 0,14

¹Media (Δ Ct de tumor - Δ Ct no de tumor emparejado) o media (Δ Ct de adenoma - Δ Ct no adenoma emparejado) de qRT-PCR. ²Calculado por ensayo de pares emparejados de Wilcoxon 2^{ΔΔ}. DT = desviación típica. Los números en negrita son estadísticamente significativos. Para las comparaciones de tumor/no tumor, se usaron 113 pares de tejidos para miR-20a y miR-203 mientras que se usaron 111 pares de tejidos para miR-21, miR-106a y miR-181b. Para todas las comparaciones de adenoma/no adenoma, se usaron 18 pares de tejido.

5 La mayoría de los tumores (89 % para miR-20a, 87 % para miR-21, 90 % para miR-106a, 71 % para miR-181b y 74 % para miR-203) tuvieron mayor expresión de estos microARN que el tejido no tumoral emparejado. Los patrones de expresión para estos cinco microARN distinguen tumor frente a estado no tumoral emparejado con precisión del 96 % o 98 % basándose en algoritmos de 3 vecinos más cercanos o centroide más cercano, respectivamente (variación cruzada 10 veces, repetida 100 veces).

10 Los inventores usaron hibridación *in situ* para visualizar la expresión de miR-21 en tumor y tejido no tumoral adyacente (véase **Figura 1a-f**).

MiR-21 se expresa a altos niveles tanto en los núcleos como en el citoplasma de células epiteliales colónicas en tejido tumoral humano en comparación con tejido no tumoral adyacente. Estos resultados son coherentes con la qRT-PCR y datos de micromatrices y apoyan un papel para los microARN en carcinogénesis.

MiR-21 se sobreexpresa a mayores niveles en adenomas de colon.

15 Los adenomas representan un estadio precursor para adenocarcinomas de colon³. Los inventores ensayaron los niveles de expresión de miR-20a, miR21, miR-106a, miR-181b y miR-203 por qRT-PCR en 18 pares de adenoma y tejido no de adenoma adyacente. Aunque cuatro de los cinco microARN mostraron niveles aumentados en tejido de adenoma, solamente miR-21 estaba significativamente enriquecido a 1,6 veces más (p=0,006, ensayo de pares emparejados de Wilcoxon) (véase **Tabla 3b**).

20 El tejido de adenoma expresó mayores niveles de miR-21 en 15/18 pares emparejados. Estadios más avanzados de tumores expresan mayores niveles de miR-21. Los sujetos se estratificaron basándose en el diagnóstico de adenoma y estadios de TNM cuando se consideró que el adenoma era el menos avanzado y el estadio IV de TNM era el más avanzado. Los adenomas expresaron niveles menores de expresión de miR-21 que los tumores de la cohorte de validación (p<0,001, ensayo de Mann-Whitney). La mayoría de los tumores avanzados expresaron mayores niveles de expresión de miR-21 (ensayo de tendencia, p<0,001) (véase Figura 1g).

25 Esta tendencia también se observó usando datos de micromatrices de microARN de la cohorte de ensayo de Maryland (p=0,04) (véase Figura 2).

La expresión alta de miR-21 predice un pronóstico negativo en dos cohortes independientes.

30 Los inventores analizaron relaciones de expresión de tumor/no tumor (T/N) de microARN individuales para determinar si alguno se asociaba con pronóstico negativo. Las relaciones de expresión de microARN T/N se clasificaron como altas basándose en el tercil más alto. Los inventores buscaron cualquier microARN en el que las relaciones de TIN altas se asociaran con supervivencia de cáncer (p<0,05). A partir de estas, los inventores seleccionaron microARN que se expresaban diferencialmente en tumores (p<0,001). Cinco microARN satisficieron estos criterios. El análisis de Kaplan-Meier indicó que las relaciones de T/N altas para miR-20a (p=0,02), miR-21

(p=0,004), miR-106a (p=0,01), miR-181b (p=0,04) y miR-203 (p=0,004) se asociaron cada una con una escasa supervivencia. Estos cinco microARN se seleccionaron para análisis adicional.

Los adenocarcinomas de colon de 89-93 % de los sujetos en este estudio fueron de histología típica. Una minoría de los tumores fueron de histologías de adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso o de carcinoma de células de anillo de sello (véase Tabla 1). Pueden asociarse diferentes subtipos de adenocarcinomas con diferentes resultados químicos, incluyendo pronóstico de supervivencia³¹. Para eliminar la confusión potencial asociada con la histología, los inventores excluyeron todos los sujetos con adenocarcinomas mucinosos, carcinomas adenoescamosos y carcinomas de células de anillo de sello del análisis inicial.

Las asociaciones de relaciones T/N con escasa supervivencia podrían deberse a niveles de expresión de microARN en el tejido tumoral, el tejido no tumoral circundante o una combinación de ambos. Para distinguir estas posibilidades los inventores analizaron la asociación de la expresión de microARN en tumores y no tumores emparejados por separado. Los niveles altos de expresión en tumores (basados en el mayor tercil) para miR-20a, miR-21, miR106a, miR-181b y miR-203 se asociaron cada uno con una escasa supervivencia en la cohorte de ensayo de Maryland (véase Figura 3a, también de datos no mostrados). No se observó asociación significativa con expresión de microARN en tejido no tumoral para ninguno de los cinco microARN.

Se usó análisis de peligros proporcionales de Cox univariante y multivariante para evaluar la asociación de los niveles de expresión tumoral con el pronóstico en individuos con adenocarcinoma típico (**Tabla 4a**).

Tabla 4 - Análisis de regresión de Cox univariante y multivariante de los niveles de expresión de miR-21 y supervivencia de cáncer global en sujetos con adenocarcinoma de colon¹

Tabla 4a				
Cohorte de ensayo de Maryland				
	Análisis univariante		Análisis multivariante ²	
Característica	HR (IC 95 %)	p-valor	HR (IC 95 %)	p-valor
Expresión de miR-21 ³ N=71				
Bajo	1,0		1,0	
Alto	2,5 (1,2-5,2)	0,01	2,9 (1,4-6,1) 0,004	
TNM estadio I-II	1,0		1,0	
III-IV	3,5 (1,6-7,9)	0,002	3,4 (1,5-7,8)	0,004
Edad en el momento de admisión <50	1,0			
≥50	0,7 (0,2-2,3)	0,52		
Sexo femenino	1,0			
Masculino	1,4 (0,5-3,9)	0,57		
Raza blanca	1,0			
Negra	1,0 (0,5-2,1)	0,97		
Localización tumoral distal	1,0			
Proximal	0,6 (0,3-1,4)	0,26		
Tabla 4b				
Cohorte de validación de Hong Kong				
	Análisis univariante		Análisis multivariante ²	
Característica	HR (IC 95 %)	p-valor	HR (IC 95 %)	p-valor
Expresión de miR-21 ³ n = 103				
Baja	1,0		1,0	
Alta	2,4 (1,4-3,9)	0,002	2,4 (1,4-4,1)	0,002
TNM estadio I-II	1,0		1,0	
III-IV	4,7 (2,4-9,5)	<0,001	4,7 (2,4-9,5)	<0,001

Edad en el momento de admisión <50	1,0			
≥50	1,5(0,9-2,6)	0,14		
Sexo femenino	1,0			
Masculino	1,4 (0,8-2,3)	0,29		
Localización tumoral distal	1,0			
Proximal	0,7 (0,3-1,4)	0,27		
La expresión de microARN se midió con micromatrices de miARN para la cohorte de Maryland y con qRT-PCR con la cohorte de Hong Kong. ¹ Se excluyeron casos con adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso o carcinoma de células de anillo de sello de este análisis. ² El análisis multivariante usó adición por etapas y se descubrió que la retirada de co-variantes clínicas estaba asociada con la supervivencia en modelos univariantes ($p<0,10$) y los modelos finales incluyen solamente las co-variantes que estaban significativamente asociadas con supervivencia (estadística de Wald $p<0,05$). ³ La expresión alta en los tumores para todos los miARN se definió basándose en el tercil más alto.				

Los individuos con tumores que expresaban niveles altos de mir-21 tenían un riesgo significativamente mayor de morir de cáncer de colon en análisis tanto univariantes (HR=2,5 [1,2-5,2], $p=0.01$) como multivariantes (HR=2,9 [1,4-6,1], $p=0,004$).

- 5 Para validar estos hallazgos, los inventores usaron qRT-PCR para medir los niveles de expresión tumoral y no tumoral para estos cinco microARN en la cohorte de validación de Hong Kong y analizaron las asociaciones con pronóstico. La expresión tumoral alta de miR-21 predice un pronóstico negativo en la cohorte de validación de Hong Kong ($p=0,001$, ensayo de rango logarítmico Kaplan-Meier) mientras que la expresión en tejido no tumoral no (véase Figura 3b).
- 10 Los inventores no descubrieron asociaciones estadísticamente significativas con el pronóstico y la expresión de miR-20a, miR-106a, 181b o miR-203 en esta cohorte.

La expresión alta de miR-21 en tumores no se asoció significativamente con la edad, género, histología tumoral o localización tumoral (ensayo exacto de Fisher) en la cohorte de validación de Hong Kong. Todas las co-variantes se examinaron por análisis de peligros proporcionales de Cox (**Tabla 4b**).
- 15 La expresión alta de miR-21 en tumores (HR=2,4 [1,4-3,9], $p=0,002$) y estadios de TNM (HR=4,7 [2,4-9,5], $p<0,001$) estaba asociada significativamente con la supervivencia en modelos univariantes. El análisis de regresión de Cox multivariante demostró que la expresión alta de miR-21 en tumores predice pronóstico de supervivencia pobre (HR=2,4 [1,4-4,1], $p=0,002$), independientemente de otras co-variantes clínicas, lo que es coherente con los hallazgos de los inventores en la cohorte de ensayo de Maryland.
- 20 Los inventores repitieron el análisis incluyendo todos los sujetos independientemente de la histología tumoral. En ambas cohortes, la asociación con expresión alta de miR-21 y pronóstico se mantuvo (véase Figura 4, véase **Tabla 5**).

Tabla 5 - Análisis de regresión de Cox univariante y multivariante de niveles de expresión de miR-21 y supervivencia de cáncer global en sujetos con todos los sujetos

Tabla 5a Cohorte de ensayo de Maryland				
	Análisis univariante		Análisis multivariante ²	
Característica	HR (IC 95 %)	p-valor	HR (IC 95 %)	p-valor
Expresión de miR-21 ³ N=79				
Bajo	1,0		1,0	
Alto	2,0 (1,1-4,0)	0,04	2,1 (1,1-4,0)	0,03
TNM estadio I-II	1,0		1,0	
III-IV	3,2 (1,5-6,9)	0,002	3,2 (1,5-6,8)	0,003
Edad en el momento	1,0			

de admisión <50				
≥50	0,7 (0,2-2,4)	0,59		
Sexo femenino	1,0			
Masculino	1,6 (0,7-4,2)	0,33		
Raza blanca	1,0			
Negra	1,0 (0,5-2,0)	0,99		
Localización tumoral distal	1,0			
Proximal	0,8 (0,3-2,1)	0,65		
Histología de Adenocarcinoma	1,0			
Mucinoso o Adenoescamoso	0,7 (0,3-2,1)	0,57		
Tabla 5b	Cohorte de validación de Hong Kong			
	Análisis univariante		Análisis multivariante ²	
Característica	HR (IC 95 %)	p-valor	HR (IC 95 %)	p-valor
Expresión de miR-21 ³ n = 111				
Baja	1,0		1,0	
Alta	2,3 (1,4-3,9) 23 (1,4-3,9)	0,002	23 (1,4-3,9)	0,002
TNM estadio I-II	1,0		1,0	
III-IV	4,9 (2,5-97)	<0,001	4,9 (2,5-98)	<0,001
Edad en el momento de admisión <50	1,0			
≥50	1,4 (0,8-2,4)	0,20		
Sexo femenino	1,0			
Masculino	1,3 (0,8-2,3)	0,27		
Localización tumoral distal	1,0			
Proximal	0,7 (0,3-1,4)	0,27		
Histología de adenocarcinoma	1,0			
Mucinoso o adenoescamoso	1,2 (0,4-3,3)	0,74		
La expresión de microARN se midió con micromatrices de miARN para la cohorte de Maryland y con qRT-PCR con la cohorte de Hong Kong. ¹ Todos los individuos se incluyeron en este análisis independientemente de la histología tumoral. El análisis multivariante usó adición por etapas y se descubrió que la retirada de las co-variantes clínicas estaba asociada con la supervivencia en modelos univariantes (p<0,10) y los modelos finales incluyen solamente las co-variantes que estaban significativamente asociadas con la supervivencia (estadística de Wald p<0,05). La expresión alta ³ en los tumores para todos los miARN se definió basándose en el tercil más alto.				

Niveles de expresión de miR-21 y respuesta a terapia.

La identificación de biomarcadores asociados con una respuesta a quimioterapia adyuvante permitirá a los médicos predecir mejor los beneficios de la terapia. Para este fin, los inventores analizaron asociaciones con expresión de miR-21 y la respuesta a quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de estadio II y III. Estuvo disponible información sobre la administración de quimioterapia adyuvante para 47 de 65 sujetos de estadio II o III en la cohorte

de ensayo de Maryland y todos los sujetos en la cohorte de validación de Hong Kong.

En ambas cohortes, los regímenes de quimioterapia estaban principalmente basados en fluorouracilo (en formas de 5-fluorouracilo intravenoso o fármacos orales incluyendo tegafur con uracilo [UFT]) con o sin Levamisol o Leocovorina. Solamente se usaron sujetos con histología de adenocarcinoma típico para este análisis, dejando 20 de los 42 individuos de estadio II/III que recibieron quimioterapia en la cohorte de Maryland. Para los que recibieron quimioterapia, la expresión alta de miR-21 en tumores predijo peor supervivencia global ($p=0,01$, ensayo de rango logarítmico de Kaplan-Meier) que proporciona apoyo preliminar a que el alto miR-21 está asociado con escasa respuesta a quimioterapia adyuvante.

Para la cohorte de validación de Hong Kong, se usaron 77 individuos con cáncer de estadio II/III con histología de adenocarcinoma típico para este análisis. Los sujetos de estadio II/III que recibieron quimioterapia adyuvante tuvieron mejor pronóstico de supervivencia que los que no ($p=0,02$, ensayo de rango logarítmico de Kaplan-Meier). Entre los sujetos que recibieron quimioterapia adyuvante ($n=36$), se asoció la expresión alta de miR-21 en tumores con una escasa respuesta a tratamiento ($p=0,03$, ensayo de rango logarítmico de Kaplan-Meier), coherente con observaciones en la cohorte de Maryland (véase Figura 5a).

En esta cohorte, todos los sujetos de estadio II que recibieron quimioterapia adyuvante ($n=11$) sobrevivieron (véase Figura 5b), pero para los sujetos de estadio III que recibieron quimioterapia adyuvante ($n=25$) la expresión alta de miR-21 se asoció con escasa supervivencia ($p=0,02$, ensayo de rango logarítmico de Kaplan-Meier) (véase Figura 5c).

Se usó análisis de regresión de Cox multivariante para analizar estas observaciones para mostrar que la expresión alta de miR-21 predecía un pronóstico negativo ($HR=3,1$ [1,5-6,1]; $p=0,001$) y recibir quimioterapia predecía resultado de supervivencia mejorados ($HR=0,3$ [0,1-0,5]; $p<0,001$) independientemente de otras co-variantes clínicas (**Tabla 6a**).

Tabla 6 - Análisis de regresión de Cox univariante y multivariante de la expresión de miR-21, recepción de quimioterapia adyuvante y supervivencia de cáncer en sujetos de estadio I/III¹ con adenocarcinoma

Tabla 6a				
Cohorte de ensayo de Maryland				
	Análisis univariante		Análisis multivariante ²	
Característica	HR (IC 95 %)	p-valor	HR (IC 95 %)	p-valor
Expresión de miR-21 ³ N=77				
Bajo	1,0		1,0	
Alto	2,6 (1,3-5,1)	0,005	3,1 (1,5-6,1)	0,001
No recibió quimioterapia adyuvante	1,0		1,0	
Recibió	0,4 (0,2-0,8)	0,01	0,3 (0,1-0,5)	<0,001
TNM de estadio II	1,0		1,0	
III	2,8 (1,3-6,0)	0,008	5,4 (2,4-12)	<0,001
Localización tumoral distal	1,0		1,0	
Proximal	0,3 (0,1-1,0)	0,04	0,2 (0,1-0,8)	0,02
Edad en el momento de admisión <50	1,0			
≥50	1,6 (0,8-3,1)	0,20		
Sexo femenino	1,0			
Masculino	1,2 (0,6-2,3)	0,61		
Tabla 6b				
Cohorte de validación de Hong Kong				
	Análisis univariante		Análisis multivariante ²	
Característica	HR (IC 95 %)	p-valor	HR (IC 95 %)	p-valor

Expresión de miR-21 ³ N = 119				
Baja	1,0		1,0	
Alta	2,6 (1,5-4,5)	0,001	3,0 (1,7-5,4)	<0,001
No recibió quimioterapia adyuvante	1,0		1,0	
Recibió	07, (0,4-1,2)	0,21	0,4 (0,2-0,8)	0,004
TNM de estadio II	1,0		1,0	
III	3,2 (1,7-6,1)	0,001	5,2 (2,6-11)	<0,001
Localización tumoral distal	1,0		1,0	
Proximal	0,4 (0,2-0,8)	0,02	0,3 (0,1-0,7)	0,007
Edad en el momento de admisión <50	1,0			
≥50	1,4 (0,7-2,5)	0,32		
Sexo femenino	1,0			
Masculino	1,3 (0,7-2,2)	0,44		
La expresión de miARN se midió con un qRT-PCR. ¹ Los sujetos con TNM estadio II/III con histología de adenocarcinoma típico se incluyeron en este análisis. ² El análisis multivariante usó adición por etapas y la retirada de co-variantes clínicas que se descubrió que estaban asociadas con la supervivencia en modelos univariantes (p<0,10) y los modelos finales incluyen solamente las co-variantes que estaban asociadas significativamente con la supervivencia (estadística de Wald p<0,05). ³ La expresión alta en tumores para todos los miARN se definió basándose en el perfil más alto. La raza no estaba asociada con pronóstico negativo.				

Los análisis usando recaída de cáncer como un criterio de valoración en lugar de muerte por cáncer dieron como resultado asociaciones similares prediciendo la expresión alta de miR-21 en tumores una reaparición de enfermedad más rápida (datos no mostrados).

- 5 Un análisis que combinaba ambas cohortes dio como resultado asociaciones similares. El análisis de Kaplan-Meier demostró que la expresión alta de miR-21 predecía un pronóstico negativo en sujetos de estadio II (p=0,02) o estadio III (p=0,004) (véase Figura 6).

- 10 La expresión alta de miR-21 predijo una escasa respuesta a quimioterapia en sujetos de estadio II/III (p=0,003) o en sujetos de estadio III solamente (p=0,007). La regresión de Cox multivariante demostró que la expresión alta de miR-21 predecía pronóstico negativo (HR=3,0 [1,7-5,4]; p<0,001) y el tratamiento con quimioterapia adyuvante predecía supervivencia mejorada (HR=0,4 [0,2-0,8]; p=0,004) independientemente de otras cualidades clínicas (Tabla 6b).

Análisis

- 15 Los inventores analizaron los perfiles de microARN en tejidos de cáncer de colon usando dos cohortes independientes. Se expresaron diferencialmente treinta y siete microARN en tejidos tumorales mediante análisis de micromatriz de microARN. Se validaron los patrones de expresión de los cinco microARN ensayados en la cohorte de Hong Kong. La potencia diferenciadora de cinco microARN para diferenciar entre tejido tumoral y no tumoral indica que se producen cambios predecibles y sistemáticos de patrones de expresión de microARN durante la tumorigénesis y son probablemente representativos de la mayoría de adenocarcinomas de colon esporádicos.

- 20 Se descubrió que todos los miR-20a y miR-21, miR-106a, miR-181b y miR-203 se expresaban a mayores niveles en tumores de colon. Estos cambios en los patrones de expresión de microARN pueden estar asociados simplemente con el cáncer de colon o ser causantes de la progresión histológica a cáncer. Hay fuertes pruebas que sugieren que los cambios en los patrones de expresión de microARN promueven la formación de tumores, especialmente para miR-20a y miR-21. MiR-20a es parte del grupo de microARN policistrónico de miR-17-92³².

- 25 La sobreexpresión de este grupo potencia la proliferación celular *in vitro*³³ y acelera la formación tumoral en modelos animales¹⁶. La expresión obligada del grupo miR-17-92 provoca aumento del tamaño del tumor y vascularización tumoral en ratones mediante la regulación negativa de la proteína Tspl antiangiogénica²⁴. Las pruebas experimentales también sugieren que el aumento de la expresión de miR-21 promueve el desarrollo tumoral. MiR-21

se expresa a altos niveles en la mayoría de los tumores sólidos^{19,34}. La sobreexpresión de miR-21 actúa como un factor anti-apoptótico en células de glioblastoma humano¹³. La inhibición de miR-21 inhibe el crecimiento celular *in vitro* e inhibe el crecimiento tumoral en modelos de ratón de xenoinjerto mediante una regulación negativa indirecta del factor anti-apoptótico Bcl-2³⁵. Los estudios en líneas celulares humanas han mostrado que miR-21 también puede dirigirse a los genes supresores de tumores PTEN³⁶ y TPM1³⁷. Todos estos datos tomados juntos apoyan un papel causativo para la expresión de microARN alterada durante la tumorigénesis.

Los adenomas representan un estadio precursor de adenocarcinoma. Los adenomas expresan altos niveles de miR-21. Si el aumento de la expresión de miR-21 promueve la progresión de tumor de colon, la expresión aumentada en adenomas puede ser un acontecimiento celular temprano en la progresión a cáncer. La inhibición de la actividad de miR-21 puede ayudar a prevenir la promoción de tumores en poblaciones con alto riesgo de cáncer de colon, tales como individuos con poliposis adenomatosa familiar³⁸.

Por lo tanto, se presentan en el presente documento pruebas que demuestran una asociación con los patrones de expresión de microARN con pronóstico de cáncer de colon y respuesta a quimioterapia adyuvante. Los tumores más avanzados expresan mayores niveles de miR-21. Se observó una asociación robusta de la expresión alta de miR-21 en tumores y escasa supervivencia en la cohorte de ensayo de Maryland y la cohorte de validación de Hong Kong, por separado.

En cada cohorte, estas asociaciones fueron independientes de todas las demás covariantes clínicas lo que indica que la expresión de miR-21 puede ser un indicador de pronóstico útil, además de determinación de estadio de TNM y otros parámetros clínicos, para ayudar a identificar los pacientes con un riesgo mayor de cáncer terminal. Estas observaciones se realizaron en dos cohortes independientes con composiciones raciales y geográficas muy diferentes. Por lo tanto, es probable que las observaciones de los inventores sean aplicables en general a otras poblaciones.

La expresión alta de miR-21 en tumores se asoció con una escasa respuesta a quimioterapia adyuvante en ambas cohortes. Estos resultados pueden ayudar a predecir los beneficios de la terapia en individuos cuyo estado de expresión de miR-21 se conoce. Además, si la expresión alta de miR-21 es causante de la escasa supervivencia de pacientes con cáncer de colon, los antagonistas^{29,39} u otros productos terapéuticos antisentido que se dirigen a miR-21 pueden tener beneficios terapéuticos en sujetos con tumores que expresan alto miR-21. Estos pueden usarse además para terapias actuales para mejorar los resultados de supervivencia.

Los inventores en el presente documento han descubierto diferencias sistemáticas en los patrones de expresión de microARN entre tumores de colon y tejido no tumoral emparejado. La expresión alta de miR-21 en tumores predice resultado de escasa supervivencia y escasa respuesta a quimioterapia adyuvante en dos cohortes independientes, independientemente del estadio y otras covariantes clínicas lo que sugiere que puede ser un biomarcador de diagnóstico útil para adenocarcinomas de colon y pronóstico de supervivencia incluyendo respuesta a terapia.

Procedimientos

Recogida de tejido y aislamiento de ARN:

Los pares de tumor de colon primario y tejidos no tumorales adyacentes vinieron de 84 pacientes reclutados del Centro Médico de la Universidad de Maryland entre 1993 y 2002, y de 113 pacientes reclutados del Hospital Queen Mary de Hong Kong entre 1991 y 2000. Se ha recogido información detallada para cada donante de tejido, incluyendo edad, sexo, estadio clínico, localización del tumor, tiempos de supervivencia de diagnóstico y recepción de quimioterapia adyuvante. La histopatología tumoral se clasificó de acuerdo con el sistema de clasificación de tumor de la Organización Mundial de la Salud¹. El tejido de adenoma se obtuvo de la Cooperative Human Tissue Network. Este estudio se aprobó por la Junta de Evaluación Institucional del Instituto Nacional de la Salud, la Junta de Evaluación Institucional de la Universidad de Hong Kong/Autoridad Hospitalaria de Hong Kong grupo occidental y la Junta de Evaluación Institucional para la investigación de sujetos humanos en la Universidad de Maryland.

Aislamiento de ARN y realización de perfiles de microARN:

Se extrajo ARN de tejido usando procedimientos de TRIZOL convencionales (Invitrogen, Carlsbad). Se realizaron perfiles de micromatrices de microARN como se ha descrito previamente³⁰. Brevemente, se marcaron 5 lag de ARN total y se hibridaron con cada micromatriz de microARN que contenía cuadruplicados de aproximadamente 400 sondas de microARN humanas. Los porta-objetos se exploraron usando un explorador PerkinElmer ScanArray LX5K. Se realizó qRT-PCR de microARN usando ensayos de microARN Taqman (Applied Biosystems, Foster City) según las instrucciones del fabricante con el sistema de RT-PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems, Foster City). U6B fue el control de normalización para todos los experimentos de qRT-PCR. Todos los ensayos se realizaron por duplicado (miR-20a y miR-203) o por triplicado (miR-21, miR-106a, miR-181b), qRT-PCR para miR-21, miR-106a y miR-181b se realizó por AJS, a ciegas para los resultados de supervivencia y datos clínicos de miembros de la cohorte de validación en ese momento.

Análisis de micromatriz:

Los datos analizados en la presente publicación se han depositado en el Ómnibus de expresión génica del NCBI (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y son accesibles mediante el número de referencia de serie GEO GSE7828. Se importaron datos de micromatrices normalizados por LOESS en herramientas de matriz BRB 3.5.0 (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) y todos los análisis de micromatrices posteriores se realizaron con este software.

Se realizaron análisis de micromatrices. Se retiraron sondas con valores que faltaban de > 20 % de las matrices del análisis dejando 230 sondas. El análisis de comparación de clases, emparejado, identificó microARN que se expresaban diferencialmente en tumores ($p < 0,001$).

Para buscar inicialmente con respecto a microARN asociados con escasa supervivencia, se analizaron las relaciones de expresión de microARN de tumor/no tumor (T/N) en la cohorte de Maryland usando datos de micromatriz. Se crearon relaciones de expresión de TN para microARN restando los valores de expresión $\log_2$ no tumorales de los $\log_2$ tumorales. Los microARN que carecían de > 25 % de las relaciones T/N se quitaron filtrando dejando 208. Las relaciones de expresión T/N se dicotomizaron con el tercil mayor clasificado como alto y los 2 terciles menores clasificados como bajo (véase Procedimientos Complementarios). Este punto de corte alto/bajo se usó universalmente a lo largo del presente estudio. Los niveles de expresión de microARN tumorales y no tumorales se normalizaron por lotes basándose en la fecha de los experimentos de micromatrices para todos los análisis de asociaciones con supervivencia.

Hibridación *in situ*:

Se realizó hibridación *in situ* (ISH) con sondas para miR-21 humano, mezcla y U6 (Exiqon, Woburn) con una versión modificada del protocolo del fabricante para tejido incluido en parafina fijado con formalina (FFPE) escrito por W. Kloosterman (http://www.exiqon.com/uploads/LNA_52-FFPE_miRNA_in_situ_protocol.pdf) en tejido de colon humano. Las modificaciones incluían el uso de anticuerpo conjugado con HRP anti-DIG policlonal de conejo y sistema de amplificación de señal de tiramida DakoCytomation GenPoint (DakoCytomation, Carpinteria), y sustrato VECTOR® NovaRed™ (Vector Laboratories, Burlingame). Se tomaron imágenes con un microscopio Olympus BX40 usando la cámara digital Olympus DP70 y software controlador DP (Olympus, Champaign).

Análisis estadístico:

Se realizaron análisis estadísticos. Se usaron ensayos de pares coincidentes de Wilcoxon para analizar las diferencias en la expresión de microARN entre tumores y tejido no tumoral emparejado así como diferencias entre adenoma y tejido sin adenoma emparejado para todos los datos de qRT-PCR. Todos los ensayos de tendencia presentados son ensayos no paramétricos con respecto a tendencia entre los grupos ordenados. Todo el análisis Kaplan-Meier se realizó con WINSTAT 2001 (R. Fitch Software). Se realizó análisis de regresión de Cox multivariante usando Intercooled Stata 9.2 (StataCorp LP, College Station). Los modelos multivariantes finales se basaron en la adición por etapas y retirada de covariantes clínicas que se había descubierto que estaban asociadas con escasa supervivencia en modelos univariantes ($p < 0,10$). Se usó una estadística de Wald de $p < 0,05$ como criterio para inclusión en modelos multivariantes finales. Todos los p valores presentados son de 2 lados. Las relaciones de riesgo se presentan con intervalos de confianza al 95 % entre paréntesis. Se realizaron gráficos de expresión usando GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego).

Análisis de micromatrices adicionales

Las micromatrices usadas para este análisis fueron micromatrices de microARN de aplicación puntual (del Centro Integral del Cáncer de la Universidad Estatal de Ohio, versión 2.0). Las intensidades de cada punto fueron la mediana de las intensidades del primer plano. Cada una de las 170 micromatrices usadas para este estudio contenía 11.520 puntos. Todos los puntos en los que la intensidad de primer plano era menor que la de fondo se reasignaron como NA (NA marca los puntos de datos ausentes). Todos los puntos marcados como deficientes por el explorador también se reasignaron como NA. Todos los puntos blancos (sin oligo) con alta intensidad de primer plano se reasignaron como NA. Cada oligo de microARN se representa por puntos cuadruplicados en estas matrices como dos pares distantes de dos puntos adyacentes. Si hubo 0 o 1 NA para un oligo cuádruple, y la media de los pares de oligo distantes diferían en > 1 en la escala $\log_2$, todos los puntos cuadruplicados se reasignaron como NA. Si hubo 2 NA para un oligo cuádruple y las dos intensidades de puntos no NA diferían en > 1 en la escala $\log_2$, todos los puntos cuadruplicados se reasignaron NA. Si hubo 3 puntos NA para un cuádruple, el punto final se reasignó como NA. En total, 1.082.689 de 1.958.400 puntos se reasignaron como NA usando estos procedimientos. Se realizó normalización por LOESS (suavizado de gráfico de dispersión ponderado localmente) usando el paquete de software R. Todos los datos se importaron después en herramientas de matrices BRB versión 3.5.0 para análisis y todos los puntos repetidos se promediaron. Se usaron originalmente 85 pares (tumor y tejido no tumoral emparejado) de matrices. Se descubrió después que un caso que se identificó originalmente como un paciente de carcinoma de colon incidente se había diagnosticado como carcinoma *in situ* por lo que se retiró del análisis, dejando la población de estudio en 84 sujetos. Las listas de microARN se filtraron para incluir solamente los 389 conjuntos de sondas hsa-miR humanos. Se filtraron adicionalmente para retirar cualquier conjunto de sondas ausente de más del 25 % de las matrices, dejando 230 conjuntos de sondas de microARN humano. Se usó análisis de comparación de clases emparejado para identificar microARN que se expresaban diferencialmente entre tumor y

tejido no tumoral emparejado. Para dos microARN (miR-181b y miR-338), dos sondas independientes que medían cada uno proporcionaron resultados contradictorios mostrando una sonda mayor expresión en tumores y mostrando una sonda menor expresión en tumores para cada microARN. Para cada uno, los inventores descartaron el resultado menos significativo que designó tanto miR-181b como miR-338 como enriquecidos en los tumores. Adicionalmente, la qRT-PCR confirmó que miR-181b estaba enriquecido en tumores.

Los inventores usaron inicialmente perfiles de expresión tumoral/no tumoral (T/N) para cada microARN para buscar microARN que estuvieran asociados con escasa supervivencia. Para este análisis, los inventores decidieron dicotomizar todos los datos de expresión con un punto de corte alto y bajo universal para buscar asociaciones con escasa supervivencia. Para determinar qué punto de corte alto/bajo universal usar, los inventores dicotomizaron los datos de expresión de T/N de tres modos separados y determinaron qué procedimiento proporcionaba el mayor número de resultados significativos en la cohorte de ensayo. La expresión alta se clasificó basándose en mayor que la mediana, tercil mayor o cuartil mayor y los inventores ensayaron las asociaciones con estos puntos de corte con una supervivencia escasa usando análisis de regresión de Cox univariante. De los 37 microARN que se expresaron diferencialmente en tumores, la expresión alta de cuatro se asoció con escasa supervivencia basándose en mayor que en la mediana, cinco basándose en el tercil mayor y dos basándose en el cuartil mayor ($p < 0,05$, datos no mostrados). La dicotomización basada en el tercil mayor proporcionó la mayor cantidad de microARN asociados con escasa supervivencia basándose en estos criterios en la cohorte de ensayo de Maryland; por lo tanto, se usó la clasificación basada en el tercil mayor uniformemente a lo largo del presente estudio para analizar las asociaciones entre los niveles de expresión de microARN y un pronóstico negativo tanto en la cohorte de ensayo de Maryland como en la cohorte de validación de Hong Kong.

Los inventores usaron micromatrices de microARN para comparar los niveles de expresión de miR-21 en tumores con pronóstico. La sonda de micromatriz usada para este análisis fue hsa-miR-21-precl7NoI. Este análisis requería normalización de lotes de los datos basándose en la fecha del experimento de micromatriz. Para normalizar por fecha, las matrices que expresaban el 1/3 mayor de un microARN dado se clasificaron como altas para cada día, por separado. Se realizaron perfiles de hasta doce pares de tejidos en cualquier día. Para cualquier día en el que se realizaron menos de 10 pares de micromatrices, las matrices realizadas en esos días se descartaron, dando como resultado la pérdida de 5 pares de matrices. Estos datos se combinan después entre sí para análisis de asociaciones con resultados de supervivencia. Los inventores comprobaron y no descubrieron diferencias significativas en la distribución de frecuencia de edad, sexo, raza, localización tumoral, estadio de TNM o supervivencia de cáncer entre grupos categorizados basándose en la fecha del experimento de micromatriz (ensayo exacto de Fisher).

Análisis estadísticos

Se usó regresión de riesgo proporcional de Cox para analizar el efecto de los niveles de expresión de miR-21 y otra variable clínica en la supervivencia del paciente. Las variables clínicas incluidas fueron: edad, sexo, raza, localización del tumor, histología del tumor, recepción de terapia adyuvante y estadio de TNM. Para estos modelos, los inventores eligieron dicotomizar la edad como edad > 50 frente a edad < 50 ya que la edad de exploración recomendada para cáncer de colon es a los 50 años; la localización del tumor se definió como próxima si el tumor se localizaba dentro o próximo a la flexura esplénica y distante si el tumor se localizaba dentro de o distante al colon descendiente; el estadio de TNM se dicotomizó basándose en enfermedad metastásica frente a no metastásica dando como resultando estadio I-II frente a III-IV. Un paciente en la cohorte de Maryland murió el día de la cirugía dando como resultado un tiempo de supervivencia de 0 meses. Este caso se incluyó en el análisis de Kaplan-Meier y se retiró para el análisis de regresión de Cox provocando la diferencia en casos entre la expresión de miR-21 en tumores para la Figura 2 ($n = 72$) y el número de casos en el análisis de regresión de Cox en la Tabla 4 ($n = 71$). Se realizó regresión de Cox univariante en cada covariante clínica para examinar la influencia de cada una en la supervivencia del paciente. Los modelos multivariantes finales se basaron en la adición por etapas y retirada de covariantes clínicas que se había descubierto que estaban asociadas con escasa supervivencia en modelos univariantes ($p < 0,10$). Se usó una estadística de Wald de $p < 0,05$ como criterio para inclusión en modelos multivariantes finales. El modelo de regresión de Cox de mayor parsimonia se usó para el modelo multivariante final.

Ejemplo 2 – Resultados iniciales

Los miARN se expresan diferencialmente en tumores de colon

Los inventores analizaron perfiles de miARN de 85 pares de tejidos de colon cancerosos y no cancerosos adyacentes usando micromatrices de miARN. Los inventores descubrieron que los perfiles de expresión de miARN de los tumores eran bastantes diferentes de los tejidos normales lo que sugiere que los miARN pueden desempeñar papeles significativos en la carcinogénesis de colon. El análisis de comparación de clase emparejado identificó 27 miARN independientes que se expresaban diferencialmente en estos tumores (Tabla 7).

Tabla 7-se expresan diferencialmente 27 miARN en tumores de colon en comparación con tejido normal emparejado. Se descubrió que 27 miARN se expresaban diferencialmente en tumores usando análisis de comparaciones de clase emparejado en herramientas de matriz BRB 3.4. Se usó un valor de significación de $p < 0,001$ como el criterio para expresión diferencial lo que dio como resultado una tasa de descubrimiento falso

estimada del 0,08 %. Positiva se refiere a miARN que se expresaron a niveles mayores en tumores mientras que negativa indica que los niveles de miARN fueron menores en tumores.

Tabla 7	MicroARN	Regulado positiva/negativamente	P-valor
1	miR-331	Negativa	1,00 E-07
2	miR-21	Positiva	1,00 E-07
3	miR-34b	Negativa	2,00e-07
4	miR-342	Negativa	2,00e-07
5	miR-215	Negativa	2,20E-05
6	miR-371	Negativa	7,00E-07
7	miR-373	Negativa	6,30E-06
8	miR-192	Negativa	7,70E-06
9	miR-148b	Negativa	1,03E-05
10	miR-138	Negativa	1,49 E-05
11	miR-301	Negativa	1,85E-05
12	miR-338	Negativa	2,63E-05
13	miR-153	Negativa	2,67E-05
14	miR-129	Negativa	3,20E-05
15	miR-222	Positiva	9,08E-05
16	miR-346	Positiva	0,000126
17	miR-204	Positiva	0,000244
18	miR.181 b	Positiva	0,000263
19	let-7a-2	Negativa	0,000272
20	miR-106a	Positiva	0,000305
21	miR-093	Positiva	0,000334
22	miR-34c	Negativa	0,000341
23	miR-219	Positiva	0,000352
24	miR-019b	Positiva	0,000364
25	miR-210	Positiva	0,000389
26	miR-185	Positiva	0,000516
27	miR-1	Negativa	0,00064

- 5 La tasa de descubrimiento falso, para abarcar los múltiples ensayos de comparación, fue de aproximadamente el 0,8 % lo que indica que la mayoría, si no todos estos miARN se expresan diferencialmente y no son el resultado de múltiples ensayos de comparación. Se descubrió que once miARN tenían niveles de expresión elevados en tumores mientras que se descubrió que 16 miARN estaban reducidos en tumores. Adicionalmente, los perfiles de miARN pudieron usarse para predecir si el tejido era o no tumoral o no tumoral con una precisión del 92 %. Basándose en

2000 permutaciones aleatorias, la probabilidad de que estas predicciones se produjeran por azar era extremadamente baja ($p < 0,0005$). Estos resultados muestran que hay diferencias sistemáticas en los perfiles de expresión de miARN entre tumores y tejido normal lo que indica que los perfiles de expresión de miARN se han alterado durante la carcinogénesis de colon.

5 Los perfiles de expresión de miARN globales predicen el pronóstico de supervivencia de cáncer de colon

Los inventores determinaron si los perfiles de expresión de miARN predicen la supervivencia del paciente. Para este análisis los inventores calcularon las relaciones de expresión de miARN tumoral frente a normal (relación TIN) para cada miARN para cada individuo. El agrupamiento jerárquico no supervisado de todas las relaciones TIN de miARN agrupa los individuos en dos grupos marcados de forma arbitraria grupo A y grupo B (Figura 7).

10 Estos dos grupos difieren significativamente tanto en el estadio clínico ($p = 0,009$; Figura 1b) como en el pronóstico de supervivencia ($p = 0,026$; Figura 7c).

Esto indicó que los perfiles de miARN eran predictivos del estadio clínico y, lo que es más importante, el pronóstico de supervivencia.

15 Se usó análisis de regresión de Cox univariante y multivariante para investigar esta relación en más detalle (Tabla 8).

Tabla 8 Análisis de regresión de Cox de perfiles de miARN globales

Se realizaron análisis de regresión de Cox univariantes (anteriormente) y multivariantes (posteriormente) para mostrar que los individuos clasificados en el grupo B de miARN tenían mayor riesgo de morir de cáncer de colon. Ni la edad, ni el género ni la raza contribuyeron significativamente al riesgo de supervivencia. Para los fines de estos

20 análisis, la edad se dicotomizó en más o menos de 50 y la raza se dicotomizó en afroamericano (AA) y caucásico.

Análisis univariante		
Variable	HR (IC 95 %)	p valor
grupo B/A	2,6 (1,0-6,3)	0,042
edad ≥ 50 /edad < 50	0,62 (0,14-2,7)	0,53
hombre/mujer	1,4 (0,48-4,0)	0,54
AA/caucásico	1,1 (0,83-2,3)	0,83
Multivariante, con ajuste para edad, sexo y raza		
grupo B/A	2,7 (01,01 a 06,08)	0,034
edad ≥ 50 /edad < 50	0,49 (0,11-2,2)	0,35
hombre/mujer	1,5 (0,52-4,4)	0,45
AA/caucásico	1,0 (0,45-2,2)	0,99

25 Los individuos del grupo B iban a tener un riesgo significativamente mayor de morir de cáncer de colon (relación de riesgo [HR] = 2,6 ($p = 0,04$)). Este riesgo permaneció significativamente alto después de ajustar con respecto a edad, etnia y sexo (HR = 2,7; $p = 0,03$). Estos resultados demuestran el potencial para usar perfiles de miARN de tumores de colon para predecir el pronóstico. Estos resultados sugieren que los miARN también pueden desempeñar un papel en la carcinogénesis de colon.

Los perfiles de miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-16h, miR-203, let-7tg, miR-29a, miR-103-2 y miR-10a predicen pronóstico de cáncer de colon

30 Los inventores identificaron miARN individuales cuyos niveles de expresión eran predictivos de pronóstico de cáncer de colon. Los inventores usaron representación de supervivencia de Kaplan Meier y análisis de regresión de Cox multivariante sobre las relaciones de TIN para identificar los patrones de expresión de miARN que se asociaban con pronóstico de supervivencia pobre. Se usaron herramientas de matriz de BRB para identificar relaciones TIN correlacionadas con escasa supervivencia (datos no mostrados). Los inventores eligieron analizar estos miARN en

35 más detalle. Los inventores también analizaron cualquier miARN que se expresaba diferencialmente en tumores ($p < 0,01$). Las relaciones TIN para cada individuo se dicotomizaron basándose en la mediana o cuartil mayor de

relaciones TIN. Los inventores también retiraron cualquier miARN del análisis en el que las relaciones TIN estaban ausentes en más de 18 individuos. Los inventores identificaron al menos 9 miARN, incluyendo miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-16h, miR-203, let-7g, miR-29a, miR-103-2 y miR-10a cuyas relaciones TIN eran predictivas de pronóstico de cáncer de colon (Figura 8, **Tabla 9**).

5 **Análisis de regresión de Cox de relaciones TIN para miARN individuales.**

Se realizaron análisis de regresión de Cox univariantes y multivariantes para mostrar que las relaciones TIN de miARN individuales podrían usarse para clasificar a los individuos con mayor riesgo de morir de cáncer de colon. Las relaciones TIN para estos 9 miARN fueron predictores significativos de pronóstico de supervivencia independientemente del estadio de TNM, edad, sexo y raza. Obsérvese que las distinciones alta/baja para miR-16b, miR-21, miR-29a, miR-103-2, miR-106a y miR-203 se clasificaron basándose en la mediana de los valores de relación TIN mientras que let-7g, miR-10a y miR-1815 se clasificaron basándose en las relaciones TIN del cuartil mayor.

Tabla 9: Análisis de regresión de Cox de las relaciones TIN para miARN individuales

HR variable (IC 95 %)		p =	n
Análisis univariante			
miR-21 alto/bajo	3,0 (1,3 7,0)	0,01	80
Análisis multivariante			
miR-21 alto/bajo	2,8 (0,02 - 06,08)	0,02	
edad ≥ 50/edad <50	0,46 (0,10-2,1)	0,32	
hombre/mujer	3,1 (0,9-11,0)	0,07	
AA/caucásico	1,2 (0,5-2,7)	0,66	
Estadio III-IV/estadio I-II	4,4 (1,6 - 11,9)	0,004	
Análisis univariante			
miR-181b alto/bajo	3,4 (1,6 - 7,5)	0,002	78
Análisis multivariante			
miR-181b alto/bajo	3,3 (1,3 - 8,2)	0,01	
edad ≥ 50/edad <50	0,39 (0,08-1 0,8)	0,23	
Hombre/mujer	2,2 (0,7-7,2)	0,17	
AA/caucásico	1,1 (0,5 - 2,5)	0,82	
Estadio III-IV/Estadio I-II	3,1 (1,2 - 8,1)	0,02	
Análisis univariante			
let-7 g alto/bajo	2,7 (1,3 - 5,9)	0,01	84
Análisis multivariante			
let-7q alto/bajo	2,5 (1,1 - 5,5)	0,03	
edad ≥ 50/edad <50	0,5 (0,1-2,4)	0,39	
Hombre/mujer	1,5 (0,5-4,4)	0,50	
AA/caucásico	1,3 (0,6-2,9)	0,50	

Estadio III-VI/Estadio I-II	3,6 (1,4 - 9,2)	0,006,	
HR variable (IC 95 %)		p =	n
Análisis univariante			
miR-103-2 alto/bajo	2,5 (1,1 - 5,6)	0,03	81
Análisis multivariante			
miR-103-2 alto/bajo	3,1 (1,3 - 7,5)	0,01	
edad ≥ 50/edad <50	0,5 (0,1-2,2)	0,36	
hombre/mujer	1,6 (0,6-4,9)	0,38	
AA/caucásico	0,8 (0,4-1,9)	0,69	
Estadio III-IV/Estadio I - II	4,4 (1,7 -11,1)	0,002	
HR variable (IC 95 %)		p =	n
Análisis univariante			
miR-16b alto/bajo	4,6 (01,07 - 12,05)	0,003	69
Análisis multivariante			
miR-16b alto/bajo	5,1 (1,8-15,9)	0,003	
edad ≥ 50/edad <50	0,4 (0,08-1,7)	0,20	
hombre/mujer	3,2 (0,8-1,7)	0,12	
AA/caucásico	0,9 (1,9-22,4)	0,003	
Estadio III-IV/Estadio I - II	6,5 (1,9-22,4)	0,003	
HR Variable (IC 95 %)		p =	n
Análisis univariante			
miR-106a alto/bajo	2,6 (1,1 - 6,1)	0,01	82
Análisis multivariante			
miR-106a alto/bajo	2,4 (1,0-5,7)	0,05	
edad ≥ 50/edad <50	0,54 (0,11-2,5)	0,44	
hombre/mujer	1,8 (0,5-6,5)	0,34	
AA/caucásico	1,1 (0,5 - 2,5)	0,84	
Estadio III-IV/Estadio I - II	5,4 (1,8-16,0)	0,002	
HR variable (IC 95 %)		p =	n

Análisis univariante			
miR-203 alto/bajo	3,8 (01,04 - 10,05)	0,01	57
Análisis multivariante			
miR-203 alto/bajo	3,2 (01,01 - 09,04)	0,03	
edad ≥ 50/edad <50	1,0 (0,1-8,1)	0,97	
hombre/mujer	1,4 (0,4 -5,1)	0,61	
AA/caucásico	0,9 (0,4-2,3)	0,83	
Estadio III-IV/Estadio I - II	3,9 (01,03 - 11,08)	0,02	
HR variable (IC 95 %)			
		p =	n
Análisis univariante			
miR-29a alto/bajo	3,1 (1,3 - 7,3)	0,01	77
Análisis multivariante			
miR-29a alto/bajo	3,2 (1,3 - 7,9)	0,01	
edad ≥ 50/edad <50	0,5 (0,1-2,2)	0,35	
hombre/mujer	2,2 (0,6-7,4)	0,22	
AA/caucásico	0,9 (0,4 2,1)	0,76	
Estadio III-IV/Estadio I - II	4,5 (1,7 - 12,2)	0,003	
HR Variable (IC 95 %)			
		p =	n
Análisis univariante			
miR-10a alto/bajo	2,7 (1,3 - 5,7)	0,01	84
Análisis multivariante			
miR-10a alto/bajo	3,5 (1,5 - 7,8)	0,003	
edad ≥ 50/edad <50	0,4 (0,1-1,9)	0,26	
hombre/mujer	1,7 (0,6-5,0)	0,34	
AA/caucásico	1,0 (0,45-2,3)	0,98	
Estadio III-IV/Estadio I - II	4,9 (01,09 - 12,02)	0,001	

La expresión de miR-21 está elevada en tumores (Tabla 7). Las relaciones TIN de miR-21 también están asociadas con estadios clínicos y pronóstico de supervivencia para pacientes de cáncer de colon, (Tabla 9, Figura 8a).

- 5 Hubo una tendencia a que los individuos con estadio de TNM más avanzado tuvieran mayores relaciones TIN ($p = 0,034$). Las relaciones TIN se dicotomizaron basándose en la mediana de los valores para cada uno de los 80 individuos con los datos. Los individuos con relaciones de expresión TIN de miR-21 altas tuvieron un peor pronóstico de supervivencia basándose en el análisis de Kaplan-Meier ($p = 0,004$) lo que sugiere que los tumores que expresan altos niveles de miR-21 son predictivos de pronóstico negativo. Estos resultados se analizaron adicionalmente con

análisis de regresión de Cox.

Los individuos con altas relaciones TIN de miR-21 tenían mayor riesgo con análisis tanto univariante (HR = 3,0; p = 0,01) como multivariante (HR = 2,8; p = 0,02) ajustados con respecto a edad, sexo, raza y estadio de TNM (Tabla 9).

5 Este resultado sugirió que los niveles de expresión de miR-21 pueden ser útiles como procedimientos de predicción de pronóstico y pueden proporcionar más valor predictivo para pronóstico de supervivencia que solamente la determinación del estadio de TNM. Se ha descubierto que miR-21 se expresa diferencialmente en muchos tipos tumorales¹²⁻¹⁸.

10 Los estudios también han demostrado que altos niveles de miR-21 pueden conducir a una inhibición de la apoptosis en células de glioblastoma⁵ mientras que la inhibición de miR-21 puede conducir a aumento de la proliferación celular en células HeLa¹⁹.

Los inventores descubrieron en el presente documento que se cree ahora que miR-21 contribuye a la carcinogénesis de colon de una manera similar.

Los inventores han descubierto que miR-106a elevado en tumores (Tabla 7) y relaciones TIN de miR-106a se asocian con pronóstico de supervivencia (Tabla 9, Figura 8b).

15 MiR-106a es un miembro de una clase de miARN parálogos que incluyen miR-17, miR-20, miR-106a y miR-106h²⁰. Estos miARN son muy similares entre sí porque difieren solamente en 1-2 nucleótidos. Debido a su similitud, todos tienen probabilidades de tener dianas similares. Resulta interesante que los cuatro de estos miARN muestran patrones similares de expresión y asociaciones con pronóstico (datos no mostrados). Los inventores presentan en el presente documento asociaciones para miR-106a, pero no descartan formalmente la posibilidad de que cualquiera o
20 todos los otros parálogos de miARN contribuyan a esta asociación. Las relaciones TIN de miR-106a se dicotomizaron basándose en la mediana de los valores para cada uno de los 82 individuos con datos. Los individuos con relaciones de expresión TIN alta de miR-106a tuvieron un peor pronóstico de supervivencia basándose en el análisis de Kaplan-Meier (p = 0,013; Figura 8b).

25 Esto sugiere que los tumores que expresan altos niveles de miR-106a son predictivos de pronóstico de supervivencia pobre. Los individuos con altas relaciones TIN de miR-106a tenían mayor riesgo con análisis tanto univariante (FIR = 2,6, p = 0,01) como multivariante (HR = 2,4; p = 0,05) ajustado con respecto a edad, sexo, raza y estadio de TNM (Tabla 7). Por lo tanto, miR-106a puede ser un predictor de pronóstico útil para pronóstico de cáncer de colon independiente del estadio de TNM. Resulta interesante que se ha mostrado que el gen supresor de tumor retinoblastoma es una diana funcional de miR-106a¹², que apoya un mecanismo de cómo miR-106a puede contribuir
30 de forma mecánica a la carcinogénesis de colon.

La sobreexpresión del grupo de miR-17-92, que contiene parálogos de miR-106a, dio como resultado desarrollo tumoral acelerado en ratones¹⁰. Esto muestra experimentalmente que los miARN de la familia de miR-106a son capaces de afectar a la carcinogénesis fortaleciendo adicionalmente la hipótesis de que miR-106a puede contribuir a la carcinogénesis y progresión tumoral.

35 Se asociaron patrones de expresión de siete miARN adicionales con la determinación de estadios clínicos y pronóstico de supervivencia pobre (Tabla 9, Figuras 8c-8i).

Existe una tendencia a que los individuos a los que se ha diagnosticado estadio de TNM más avanzado tuvieran mayores relaciones TIN para let-7a (p = 0,010), miR-10a (p = 0,008), miR-16h (p = 0,048), miR-29a (p = 0,005), miR-103-2 (p = 0,033), miR-181H (p = 0,016), y miR-203 (p = 0,016) (Figura 8).

40 Las relaciones TIN se dicotomizaron basándose en la mediana (miR-16h, miR-29a, miR-103-2, miR-203) o cuartil mayor (let-7 g, miR-10a, miR-181H) y el análisis de Kaplan Meier reveló que se descubrió que las relaciones TIN altas para cada uno eran predictores de pronóstico de supervivencia pobre (Figuras 8c-8i).

El análisis de regresión de Cox univariante y multivariante confirmó que las relaciones TIN altas de uno cualquiera de estos miARN eran predictivas de pronóstico de cáncer de colon negativo independientemente del estado de TNM
45 (Tabla 9). Los modelos de regresión de Cox multivariantes que se ajustaron con respecto a edad, sexo, raza y estadio de TNM mostraron que las relaciones TIN altas para miR-16b (HR = 5,1, p = 0,003), let-7g (HR = 2,5; p = 0,03), miR-10a (HR = 3,4, p = 0,003), miR-29a (HR = 3,2; p = 0,01), miR-103-2 (HR = 3,1; p = 0,01), miR-181H (HR = 3,2; p = 0,01) y miR-203 (HR = 3,2; p = 0,03) eran cada una predictivas de pronóstico de supervivencia pobre. Estos resultados sugieren que los pacientes con tumores que expresan altos niveles de cualquiera de estos miARN
50 tienen un riesgo aumentado de morir de cáncer de colon. Por lo tanto, los niveles de expresión de cualquiera de estos miARN pueden ser biomarcadores útiles que pueden ayudar a predecir riesgos de supervivencia para pacientes con cáncer de colon independientemente del estadio.

La identificación de expresión de miARN de 9 miARN predice pronóstico de supervivencia:

Los inventores usaron las relaciones TIN de los 9 miARN previamente mencionados para desarrollar una

identificación de miARN que podría usarse para predecir pronóstico de cáncer de colon. Los individuos que carecían de más de 2 de 9 de estos valores se excluyeron de este análisis. El agrupamiento jerárquico de las relaciones TIN de los 9 miARN dio como resultado el agrupamiento de los 78 pacientes restantes en dos grupos (Figura 9a).

- 5 Estos grupos tenían pronósticos de supervivencia significativamente diferentes (Figura 9b; $p = 0,004$). El análisis de regresión de Cox univariante ($HR = 3,2$, $p = 0,008$) y multivariante ($HR = 2,8$; $p = 0,04$) demostró que la identificación de miARN se asociaba con pronóstico de supervivencia pobre independientemente del estadio de TNM (**Tabla 10**).

Tabla 10 - Análisis de regresión de Cox de identificación de microARN

Análisis univariante		
Variable	HR (IC 95 %)	p valor
Grupo de 9 miR B/A	3,2 (1,4-7,8)	0,008
Multivariante, ajustado con respecto a edad, sexo y raza		
Variable	HR (IC 95 %)	p valor
Grupo de 9 miR B/A	2,8 (1,0-7,4)	0,043
edad ≥ 50 /edad <50	0,4, (0,08-1,8)	0,23
hombre/mujer	1,9 (0,6-6,6)	0,29
AA/caucásico	0,9 (01,04 - 10,07)	0,82
Estadio III-IV/Estadio I - II	3,9 (01,04 - 10,07)	0,007

- 10 Se realizaron análisis de regresión de Cox univariantes (anteriormente) y multivariantes (ajustados con respecto a edad, sexo, raza y estadio; posteriormente) para mostrar que los individuos clasificados en el grupo B usando la identificación de 9 miARN tenía mayor riesgo de morir de cáncer de colon. Ni la edad, ni el sexo ni la raza contribuyeron significativamente al riesgo de supervivencia. Este riesgo asociado con la asignación de grupo es independiente del estadio.

- 15 Estos resultados demuestran que las identificaciones de miARN pueden usarse como un biomarcador para predecir el pronóstico de supervivencia de pacientes con cáncer de colon.

Análisis

- 20 Los miARN individuales se expresan diferencialmente en tumores de colon^{12,13} lo que sugiere que la expresión alterada de estos miARN puede ser parte de los cambios celulares responsables de la carcinogénesis de colon. Además de estos hallazgos, los inventores muestran en el presente documento que los perfiles de expresión de miARN están asociados con identificación de estadio de cáncer de colon y pronóstico. Por lo tanto los miARN, analizados individualmente o como parte de una identificación de miARN, pueden usarse como biomarcadores que permitirán a los médicos predecir el riesgo de supervivencia del paciente con mayor precisión.

- 25 Las fuertes asociaciones de las relaciones TIN de miARN con el pronóstico de supervivencia sugieren que la expresión de miARN alterada puede ser parte de la ruta causal en carcinogénesis de colon y progresión. Si la expresión alterada de cualquiera de estos miARN es causante de carcinogénesis, puede ser posible diseñar productos farmacéuticos de tipo antagomir que pueden usarse para tratar el cáncer. Usando los perfiles de miARN y productos terapéuticos basados en miARN, es posible diseñar estrategias de tratamiento farmacológico personalizadas basándose en las cuales estos nueve miARN se alteran. Adicionalmente, estas estrategias pueden ser útiles en la prevención de cáncer de colon en personas que tienen alto riesgo debido a riesgos heredados genéticamente o historial de cáncer previo.

Ejemplo 3

Procedimientos, reactivos y kits para diagnóstico, determinación de estadio, pronóstico, supervisión y tratamiento de enfermedades relacionados con cáncer de colon.

- 35 En una realización, se proporciona un procedimiento de diagnóstico para evaluar si un paciente tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon o tiene riesgo mayor del normal para desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon, que comprende las etapas de comparar el nivel de expresión de un marcador en una muestra del paciente y el nivel normal de expresión del marcador en un control, por ejemplo, una muestra de un

paciente sin una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Un nivel significativamente mayor de la expresión del marcador en la muestra del paciente en comparación con el nivel normal es un indicio de que el paciente está aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon o tiene riesgo mayor del normal para desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

- 5 Los marcadores se seleccionan de modo que el valor predictivo positivo de los procedimientos sea de al menos aproximadamente el 10 %, y en ciertas realizaciones no limitantes, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 90 %. También se prefieren para su uso en los procedimientos marcadores que se expresan diferencialmente, en comparación con células normales, al menos dos veces en al menos
- 10 75 %.

En un procedimiento de diagnóstico para evaluar si un paciente está aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon (por ejemplo, nueva detección (“exploración”), detección de recurrencia, ensayo de reflejos), el procedimiento comprende comparar: a) en el nivel de expresión de un marcador en una muestra del paciente y b) el nivel normal de expresión del marcador en una muestra de enfermedad relacionada con cáncer no de colon de control. Un nivel significativamente mayor de expresión del marcador en la muestra del paciente en comparación con

15 el nivel normal es un indicio de que el paciente está aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

También se proporcionan procedimientos de diagnóstico para evaluar la eficacia de una terapia para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente. Dichos procedimientos comprenden comparar: a) la expresión de un marcador en una primera muestra obtenida del paciente antes de proporcionar al menos una parte

20 de la terapia del paciente y b) expresión del marcador en una segunda muestra obtenida del paciente después de provisión de la parte de la terapia. Un nivel significativamente menor de expresión del marcador en la segunda muestra en relación con la de la primera muestra es un indicio de que la terapia es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el paciente.

Se apreciará que en estos procedimientos la “terapia” puede ser cualquier terapia para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de colon incluyendo, pero sin limitación, composiciones farmacéuticas, terapia génica y terapia biológica tales como la administración de anticuerpos y quimiocinas. Por lo tanto, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para evaluar a un paciente antes, durante y después de la terapia, por ejemplo, para evaluar la reducción de la patología.

25

En ciertos aspectos, los procedimientos de diagnóstico se refieren a terapia usando un agente químico o biológico. Estos procedimientos comprenden comparar: a) la expresión de un marcador en una primera muestra obtenida del paciente y mantenida en presencia del agente químico o biológico, y b) expresión del marcador en una segunda muestra obtenida del paciente y mantenida en ausencia del agente. Un nivel de expresión significativamente menor del marcador en la segunda muestra en relación con la de la primera muestra es un indicio de que el agente es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el paciente. En una realización, la primera y

30 segunda muestras pueden ser partes de una única muestra obtenida del paciente o partes de muestras agrupadas obtenidas del paciente.

35

También se proporciona un procedimiento de supervisión para evaluar la progresión de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente, comprendiendo el procedimiento: a) detectar en una muestra de paciente en un primer punto temporal, la expresión de un marcador; b) repetir la etapa a en un punto temporal posterior en el tiempo; y c) comparar el nivel de expresión detectado en las etapas a) y b), y a partir de ellas supervisar la progresión de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el paciente. Un nivel significativamente superior de expresión del marcador en la muestra en un punto temporal posterior al de la muestra en el primer punto temporal es un indicio de que la enfermedad relacionada con cáncer de colon ha progresado, mientras que un nivel significativamente menor de expresión es un indicio de que la enfermedad relacionada con cáncer de colon ha retrocedido.

40

45

Se proporciona además un procedimiento de diagnóstico para determinar si una enfermedad relacionada con cáncer de colon ha empeorado o es probable que empeore en el futuro, comprendiendo el procedimiento comparar: a) el nivel de expresión de un marcador en una muestra del paciente y b) el nivel normal de expresión del marcador en una muestra de control. Un nivel significativamente superior de expresión en la muestra del paciente en comparación con el nivel normal es un indicio de que la enfermedad relacionada con cáncer de colon ha empeorado o es probable que empeore en el futuro.

50

También se proporciona un procedimiento de ensayo para seleccionar una composición para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente. Este procedimiento comprende las etapas de: a) obtener una muestra que comprende células del paciente, b) mantener por separado alícuotas de la muestra en presencia de una pluralidad de composiciones de ensayo; c) comparar la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas; y d) seleccionar una de las composiciones de ensayo que reduce significativamente el nivel de expresión del marcador en la alícuota que contiene esta composición de ensayo, en relación con los niveles de expresión del marcador en presencia de las otras composiciones de ensayo.

55

Se proporciona adicionalmente un procedimiento de ensayo para evaluar el potencial perjudicial de un compuesto para provocar una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Este procedimiento comprende las etapas de: a) mantener alícuotas separadas de células en presencia y ausencia del compuesto; y b) comparar la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas. Un nivel significativamente mayor de expresión del marcador en la alícuota mantenida en presencia del compuesto, en relación con el de la alícuota mantenida en ausencia del compuesto, es un indicio de que el compuesto posee dicho potencial perjudicial.

Además, se proporciona adicionalmente un procedimiento para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente. Este procedimiento comprende las etapas de: a) obtener una muestra que comprende células del paciente; b) mantener por separado alícuotas de la muestra en presencia de una pluralidad de composiciones; c) comparar la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas; y d) administrar al paciente al menos una de las composiciones que reduce significativamente el nivel de expresión del marcador en la alícuota que contiene esta composición, en relación con los niveles de expresión del marcador en presencia de las otras composiciones.

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

Puede realizarse cualquiera de los procedimientos anteriores usando al menos uno o una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 5 o 10 o más) de marcadores de enfermedad relacionada con cáncer de colon, incluyendo marcadores de enfermedad relacionada con cáncer de colon.

En dichos procedimientos, el nivel de expresión en la muestra de cada uno de una pluralidad de marcadores, al menos uno de los cuales es un marcador, se compara con el nivel normal de expresión de cada uno de la pluralidad de marcadores en muestras del mismo tipo obtenidas de seres humanos de control no aquejados de una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Un nivel de expresión significativamente alterado (es decir, aumentado o reducido según se especifica en los procedimientos anteriormente descritos usando un único marcador) en la muestra de uno o más marcadores, o alguna combinación de los mismos, en relación con el nivel normal o de control correspondiente de ese marcador, es un indicio de que el paciente esté aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Para todos los procedimientos anteriormente mencionados, el marcador o los marcadores se seleccionan de modo que el valor predictivo positivo del procedimiento sea al menos aproximadamente del 10 %.

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

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

En una realización adicional, los kits son útiles para evaluar la presencia de células de enfermedad relacionada con cáncer de colon, comprendiendo el kit una sonda de ácido nucleico que se une específicamente con un ácido nucleico marcador o un fragmento del ácido nucleico. El kit también puede comprender una pluralidad de sondas, uniéndose cada una de las sondas específicamente con un ácido nucleico marcador, o un fragmento del ácido nucleico.

En un aspecto adicional, se proporcionan procedimientos para tratar a un paciente aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon o en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Dichos procedimientos pueden comprender reducir la expresión y/o interferir con la función biológica de un marcador. En una realización, el procedimiento comprende proporcionar al paciente un oligonucleótido o polinucleótido antisentido complementario de un ácido nucleico marcador, o un segmento del mismo. Por ejemplo, puede proporcionarse un polinucleótido antisentido al paciente mediante el suministro de un vector que exprese un polinucleótido antisentido de un ácido nucleico marcador o un fragmento del mismo. En otra realización, el procedimiento comprende proporcionar al paciente un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se une

específicamente con una proteína marcadora o un fragmento de la proteína.

En un aspecto general, se proporciona un procedimiento para producir un modelo animal no humano para evaluación de al menos una enfermedad relacionada con cáncer de colon. El procedimiento incluye exponer al animal a dosis repetidas de al menos un compuesto químico que se cree que provoca cáncer de colon. En ciertos aspectos, el procedimiento incluye además recoger una o más muestras seleccionadas del animal; y comparar la muestra recogida con uno o más indicios de inicio o desarrollo de cáncer de colon potencial.

En aspectos generales, se proporciona un procedimiento para producir el modelo animal que incluye: mantener el animal en un ambiente sin compuestos químicos específicos y sensibilizar al animal con al menos un compuesto químico que se cree que provoca cáncer de colon. En ciertas realizaciones, al menos una parte del colon del animal se sensibiliza por múltiples exposiciones secuenciales.

En un aspecto general, se proporciona un procedimiento para explorar un agente con respecto a eficacia contra al menos una enfermedad relacionada con cáncer de colon. El procedimiento incluye en general: administrar al menos un agente al animal, determinar si el agente reduce o agrava uno o más síntomas de la enfermedad relacionada con cáncer de colon; correlacionar una reducción en uno o más síntomas con eficacia del agente contra la enfermedad relacionada con cáncer de colon; o correlacionar una falta de reducción en uno o más síntomas con ineficacia del agente.

El modelo animal es útil para evaluar una o más rutas metabólicas que contribuyen al menos a uno de inicio, progresión, gravedad, patología, agresividad, grado, actividad, discapacidad, mortalidad, morbilidad, subclasificación de enfermedad u otra característica patógena o patológica subyacente de al menos una enfermedad relacionada con cáncer de colon. El análisis puede ser por uno o más de: agrupamiento jerárquico, construcción de redes de identificaciones, análisis proteómico por espectroscopia de masas, resonancia de plasmón superficial, realización de modelos estadísticos lineales, análisis diferenciador de mínimos cuadrados parciales, y análisis de regresión lineal múltiple.

En un aspecto particular, el modelo animal se evalúa con respecto a al menos una enfermedad relacionada con cáncer de colon, examinando un nivel de expresión de uno o más marcadores, o un equivalente funcional del mismo.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se usan técnicas convencionales para procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Mullis y col. Patente de Estados Unidos Nº 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (Hames & Higgins eds., 1984); Transcription And Translation (Hames & Higgins eds., 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller y Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu y col. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986); The Laboratory Rat, jefe de redacción: Mark A. Suckow; autores: Sharp y LaRegina. CRC Press, Boston, 1988 y procedimientos químicos.

Se describen en el presente documento marcadores de reciente descubrimiento asociados con un estado inducido por cáncer de colon de diversas células. Se ha descubierto que el nivel de expresión mayor de lo normal de cualquiera de estos marcadores o combinación de estos marcadores se correlaciona con la presencia de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente. Se proporcionan procedimientos para detectar la presencia de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en una muestra; la ausencia en una muestra; el estadio de una enfermedad relacionada con cáncer de colon; y otras características de una enfermedad relacionada con cáncer de colon que son relevantes para la evaluación, prevención, diagnóstico, caracterización y terapia de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente. También se proporcionan procedimientos para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

Definiciones Como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en esta sección.

El artículo "un" se usa en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Como ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Un "marcador" es un gen o proteína cuyo nivel de expresión alterado en un tejido o célula de su nivel de expresión en tejido o célula normal o sano se asocia con una patología.

El nivel "normal" de expresión de un marcador es el nivel de expresión del marcador en células del sistema de colon

de un sujeto humano o paciente no aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

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

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

Un kit es cualquier producto manufacturado (por ejemplo un envase o recipiente) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, una sonda, para detectar específicamente la expresión de un marcador. El kit puede promoverse, distribuirse o venderse como una unidad para realizar los procedimientos de la presente invención.

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

Las composiciones, los kits y los procedimientos descritos en el presente documento tienen los siguientes usos, entre otros: 1) evaluar si un paciente está aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon; 2) evaluar el estadio de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente humano; 3) evaluar el grado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 4) evaluar la naturaleza de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 5) evaluar el potencial para desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 6) evaluar el tipo histológico de células asociado con una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 7) realizar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o derivados de anticuerpo que son útiles para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de colon y/o evaluar si un paciente está aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon; 8) evaluar la presencia de células de enfermedad relacionada con cáncer de colon; 9) evaluar la eficacia de uno o más compuestos de ensayo para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 10) evaluar la eficacia de una terapia para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 11) supervisar la progresión de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 12) seleccionar una composición o terapia para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 13) tratar a un paciente aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon; 14) inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 15) evaluar el potencial perjudicial de un compuesto de ensayo; y 16) prevenir la aparición de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

Procedimientos de exploración

Los modelos animales creados por los procedimientos descritos en el presente documento permitirán la exploración de agentes terapéuticos útiles para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con cáncer de colon. En consecuencia, los procedimientos son útiles para identificar agentes terapéuticos para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Los procedimientos comprenden administrar un agente candidato a un modelo animal realizado por los procedimientos descritos en el presente documento, evaluar al menos una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon en el modelo animal en comparación con un modelo animal de control al que no se ha administrado el agente candidato. Si se reducen los síntomas o se retarda la aparición de al menos una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon, el agente candidato es un agente para tratar o prevenir la enfermedad relacionada con cáncer de colon.

Los agentes candidatos pueden ser agentes farmacológicos ya conocidos en la técnica o pueden ser agentes que se ha desconocido previamente que tengan ninguna actividad farmacológica. Los agentes pueden ser de origen natural o diseñados en laboratorio. Pueden estar aislados de microorganismos, animales o plantas, o pueden producirse de forma recombinante, o sintetizarse por cualquier procedimiento químico adecuado. Pueden ser moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos o peptidomiméticos. En ciertas realizaciones, los agentes candidatos son compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 dalton. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas. También se encuentran agentes candidatos entre biomoléculas que incluyen, pero sin limitación: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Se obtienen agentes candidatos de una amplia diversidad de fuentes incluyendo bibliotecas de compuestos

sintéticos o naturales. Hay, por ejemplo, numerosos medios disponibles para síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorios. Como alternativa, están disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Adicionalmente, las bibliotecas y compuestos producidos de forma natural o sintética se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. En ciertas realizaciones, los agentes candidatos pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en la técnica de procedimientos de bibliotecas combinatorias, incluyendo como ejemplo pero sin limitación: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase de solución o fase sólida paralelas espacialmente direccionables; procedimientos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución; el procedimiento de biblioteca de "una perla un compuesto"; y procedimientos de bibliotecas sintéticas que usan selección de cromatografía de afinidad.

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

Los mismos procedimientos para identificar agentes terapéuticos para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de colon también pueden usarse para validar compuestos candidatos/agentes generados a partir de estudios *in vitro*.

El agente candidato puede ser un agente que regula positiva o negativamente una o más rutas de respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon. En ciertas realizaciones, el agente candidato puede ser un antagonista que afecta a dicha ruta.

Procedimientos para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de colon

Se proporcionan en el presente documento procedimientos para tratar, inhibir, aliviar o invertir una respuesta a enfermedad relacionado con cáncer de colon. En los procedimientos descritos en el presente documento, un agente que interfiere con una cascada de señalización se administra a un individuo que lo necesite, tal como, pero sin limitación, pacientes con enfermedad relacionada con cáncer de colon en los que dichas complicaciones no son aún evidentes y los que ya tienen al menos una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon.

En el caso anterior, dicho tratamiento es útil para evitar la aparición de dicha respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon y/o reducir el grado en el que se produce. En el último caso, dicho tratamiento es útil para reducir el grado en que se produce dicha respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon, evitar su desarrollo posterior o invertir la respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon.

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

Expresión de un marcador

La expresión de un marcador puede inhibirse de varias maneras, incluyendo, como ejemplo no limitante, poder proporcionarse un oligonucleótido antisentido a las células de enfermedad relacionada con cáncer de colon para inhibir la transcripción, traducción o ambos, del marcador o los marcadores. Como alternativa, puede proporcionarse un polinucleótido que codifica un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una proteína marcadora, y ligado operativamente con una región promotora/reguladora apropiada a la célula para generar anticuerpos intracelulares que inhibirán la función o actividad de la proteína. La expresión y/o función de un marcador también puede inhibirse tratando la célula de enfermedad relacionada con cáncer de colon con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una proteína marcadora. Usando los procedimientos descritos en el presente documento, puede explorarse una diversidad de moléculas, particularmente incluyendo moléculas suficientemente pequeñas que pueden cruzar la membrana celular, para identificar moléculas que inhiben la expresión de un marcador o inhibir la función de una proteína marcadora. El compuesto identificado de este modo puede proporcionarse al paciente para inhibir células de enfermedad relacionada con cáncer de colon del paciente.

Puede usarse cualquier marcador o combinación de marcadores, así como cualquiera de ciertos marcadores en combinación con los marcadores, en las composiciones, los kits y los procedimientos descritos en el presente documento. En general, es deseable usar marcadores para los que la diferencia entre el nivel de expresión del marcador en células de enfermedad relacionada con cáncer de colon y el nivel de expresión del mismo marcador en células del sistema de colon normal sea tan alto como sea posible. Aunque esta diferencia puede ser tan pequeña como el límite de detección del procedimiento para evaluar la expresión del marcador, es deseable que la diferencia sea al menos mayor que el error típico del procedimiento de evaluación y, en ciertas realizaciones, una diferencia de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 100, 500, 1000 veces o más que el nivel de expresión del mismo marcador en tejido normal.

Se reconoce que ciertas proteínas marcadoras se secretan al espacio extracelular que rodea las células. Estos marcadores se usan en ciertas realizaciones de las composiciones, los kits y los procedimientos, debido al hecho de que dichas proteínas marcadoras pueden detectarse en una muestra de fluido corporal asociada con cáncer de

colon, que puede recogerse más fácilmente de un paciente humano que una muestra de biopsia tisular. Además, las técnicas *in vivo* para detección de una proteína marcadora incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse por técnicas de captura de imágenes convencionales.

- 5 Para determinar si cualquier proteína marcadora particular es una proteína secretada, la proteína marcadora se expresa, por ejemplo, en una célula de mamífero, tal como una línea de colon humano, se recoge líquido extracelular y se evalúa la presencia o ausencia de la proteína en el líquido extracelular (por ejemplo usando un anticuerpo marcado que se une específicamente con la proteína).

- 10 Se apreciará que pueden usarse muestras de pacientes que contienen células de colon en los procedimientos descritos en el presente documento. En estas realizaciones, el nivel de expresión del marcador puede evaluarse evaluando la cantidad (por ejemplo, cantidad absoluta o concentración) del marcador en una muestra. La muestra celular puede, por supuesto, someterse a una diversidad de técnicas preparatorias y de almacenamiento después de la recogida (por ejemplo, extracción de ácido nucleico y/o proteína, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación, etc.) antes de evaluar la cantidad del marcador en la muestra.

También se apreciará que los marcadores pueden desprenderse de las células en el sistema digestivo, el torrente sanguíneo y/o espacios intersticiales. Los marcadores desprendidos pueden ensayarse, por ejemplo, examinando el suero o el plasma.

- 20 Las composiciones, los kits y los procedimientos pueden usarse para detectar expresión de proteínas marcadoras que tienen al menos una parte que se presenta en la superficie de células que las expresan. Por ejemplo, pueden usarse procedimientos inmunológicos para detectar dichas proteínas en células completas, o pueden usarse procedimientos de análisis de secuencia basados en ordenador para predecir la presencia de al menos un dominio extracelular (es decir, incluyendo tanto proteínas secretadas como proteínas que tengan al menos un dominio de superficie celular). La expresión de una proteína marcadora que tiene al menos una parte que se presenta en la superficie de una célula que la expresa puede detectarse sin lisis necesariamente la célula (por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente con un dominio de superficie celular de la proteína).

- La expresión de un marcador puede evaluarse por cualquiera de una amplia diversidad de procedimientos para detectar la expresión de un ácido nucleico o proteína transcritos. Los ejemplos no limitantes de dichos procedimientos incluyen procedimientos inmunológicos para detección de proteínas secretadas, de superficie celular, citoplásmicas o nucleares, procedimientos de purificación de proteínas, ensayos de función o actividad proteica, procedimientos de hibridación de ácidos nucleicos, procedimientos de transcripción inversa de ácidos nucleicos y procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos.

- 35 En una realización particular, la expresión de un marcador se evalúa usando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcador con fluoróforo o marcado con enzima), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par de proteína-ligando) o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente con una proteína marcadora o fragmento de la misma, incluyendo una proteína marcadora que ha experimentado toda o una parte de su modificación postraduccion normal.

- 40 En otra realización particular, se evalúa la expresión de un marcador preparando ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) a partir de células en una muestra del paciente, e hibridando el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complemento de un ácido nucleico marcador, o un fragmento del mismo. El ADNc puede, opcionalmente, amplificarse usando cualquiera de una diversidad de procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa antes de hibridación con el polinucleótido de referencia; preferentemente, no se amplifica.
- 45 La expresión de uno o más marcadores puede detectarse de forma similar usando PCR cuantitativa para evaluar el nivel de expresión del marcador o marcadores. Como alternativa, puede usarse cualquiera de los muchos procedimientos para detectar mutaciones o variantes (por ejemplo, polimorfismos de un único nucleótido, deleciones, etc.) de un marcador para detectar la aparición de un marcador en un paciente.

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

- En ciertas realizaciones, los ensayos de biomarcadores pueden realizarse usando espectrometría de masas o resonancia de plasmón superficial. En diversas realizaciones, el procedimiento para identificar un agente activo contra una enfermedad relacionada con cáncer de colon puede incluir a) proporcionar una muestra de células que contiene uno o más marcadores o derivados del mismo; b) preparar un extracto de dichas células; c) mezclar dicho extracto con una sonda de ácido nucleico marcada que contiene un sitio de unión al marcador; y d) determinar la formación de un complejo entre el marcador y la sonda de ácido nucleico en presencia o ausencia del agente de ensayo. La etapa de determinación puede incluir someter a dicha mezcla de sondas de ácido nucleico/extracto a un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética.
- En ciertas realizaciones, la etapa de determinación comprende un ensayo seleccionado de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos basados en fluorescencia y ensayos de ultra alto rendimiento, por ejemplo ensayos de resonancia de plasmón superficial (SPR) o espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS). En dichas realizaciones, el sensor de SPR es útil para observación en tiempo real directa de interacciones biomoleculares puesto que SPR es sensible a cambios del índice refractivo mínimos en una superficie dieléctrica metálica. SPR es una técnica de superficie que es sensible a cambios de 10^5 a 10^6 unidades del índice refractivo (IR) a una distancia de aproximadamente 200 nm de la interfaz de muestra/sensor SPR. Por lo tanto, la espectroscopia de SPR es útil para supervisar el crecimiento de películas orgánicas finas depositadas en la capa sensora.
- Debido a que las composiciones, los kits y los procedimientos se basan en la detección de una diferencia en los niveles de expresión de uno o más marcadores, se desea que el nivel de expresión del marcador sea significativamente mayor que el límite de detección mínimo del procedimiento usado para evaluar la expresión en al menos una de células normales y células afectadas por cáncer de colon.
- Se entiende que por exploración rutinaria de muestras de pacientes adicionales usando uno o más de los marcadores, se conseguirá que algunos de los marcadores se sobreexpresen en células de diversos tipos, incluyendo enfermedades relacionadas con cáncer de colon específicas.
- Además, puesto que un mayor número de muestras de pacientes se evalúan para expresión de los marcadores y los resultados de los pacientes individuales de los que se obtuvieron muestras están correlacionados, también se confirmará que la expresión alterada de algunos de los marcadores está fuertemente correlacionada con una enfermedad relacionada con cáncer de colon y que la expresión alterada de otros marcadores está fuertemente correlacionada con otras enfermedades. Las composiciones, los kits y los procedimientos son por lo tanto útiles para caracterizar uno o más del estadio, grado, tipo histológico y naturaleza de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en pacientes.
- Cuando las composiciones, los kits y los procedimientos se usan para caracterizar uno o más del estadio, grado, tipo histológico y naturaleza de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente, se desea que el marcador o panel de marcadores se seleccione de modo que se obtenga un resultado positivo en al menos aproximadamente el 20 %, y en ciertas realizaciones, al menos aproximadamente el 40 %, 60 % u 80 %, y sustancialmente en todos los pacientes aquejados de una enfermedad relacionada con cáncer de colon del estadio, grado, tipo histológico o naturaleza correspondiente. El marcador o panel de marcadores de la invención puede seleccionarse de modo que se obtenga un valor predictivo positivo de más de aproximadamente el 10 % para la población general (en un ejemplo no limitante, acoplado con una especificidad de ensayo mayor del 80 %).
- Cuando se usa una pluralidad de marcadores en las composiciones, los kits y los procedimientos, el nivel de expresión de cada marcador en una muestra de paciente puede compararse con el nivel normal de expresión de cada uno de la pluralidad de marcadores en muestras de cáncer no de colon del mismo tipo, en una única mezcla de reacción (es decir usando reactivos, tales como sondas fluorescentes diferentes, para cada marcador) o en mezclas de reacción individuales que se corresponden con uno o más de los marcadores. En una realización, un nivel de expresión significativamente aumentado de más de uno de la pluralidad de marcadores en la muestra, en relación con los niveles normales correspondientes, es un indicio de que el paciente está aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Cuando se usa una pluralidad de marcadores, pueden usarse 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 20, 30 o 50 o más marcadores individuales; en ciertas realizaciones, puede desearse el uso de menos marcadores.
- Para maximizar la sensibilidad de las composiciones, los kits y los procedimientos (es decir mediante interferencia atribuible a células de un origen de sistema no de colon en una muestra del paciente), es deseable que el marcador usado en los mismos sea un marcador que tenga una distribución tisular restringida, por ejemplo, que normalmente no se exprese en un tejido de sistema no de colon.
- Se reconoce que las composiciones, los kits y los procedimientos serán particularmente útiles para pacientes que tengan un riesgo potenciado de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon y sus asesores médicos. Los pacientes que se reconoce que tienen un riesgo potenciado de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon incluyen, por ejemplo, pacientes que tengan un historial familiar de una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

El nivel de expresión de un marcador en tejido del sistema de colon humano normal puede evaluarse de una diversidad de maneras. En una realización, el nivel normal de expresión se evalúa evaluando el nivel de expresión del marcador en una parte de células del sistema del colon que parecen ser normales y comparando este nivel normal de expresión con el nivel de expresión en una parte de las células del sistema de colon que se sospecha que son anómalas. Como alternativa, y particularmente a medida que está disponible información adicional como resultado de la realización rutinaria de los procedimientos descritos en el presente documento, pueden usarse valores medios poblacionales para la expresión normal de los marcadores. En otras realizaciones, el nivel "normal" de expresión de un marcador puede determinarse evaluando la expresión del marcador en una muestra de paciente obtenida de un paciente aquejado de cáncer no de colon, de una muestra de paciente obtenida de un paciente antes de la aparición sospechada de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el paciente, de muestras del paciente archivadas y similares.

También se proporcionan en el presente documento composiciones, kits y procedimientos para evaluar la presencia de células de enfermedad relacionada con cáncer de colon en una muestra (por ejemplo una muestra tisular archivada o una muestra obtenida de un paciente). Estas composiciones, kits y procedimientos son sustancialmente las mismas que se han descrito anteriormente, excepto que, cuando sea necesario, las composiciones, los kits y los procedimientos se adaptan para su uso con muestras distintas de muestras de paciente. Por ejemplo, cuando la muestra para usar es una muestra tisular humana archivada, paraafinizada, puede ser necesario ajustar la relación de compuestos en las composiciones, en los kits, o en los procedimientos usados para evaluar niveles de expresión de marcador en la muestra.

Kits y reactivos

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

Los kits pueden comprender opcionalmente componentes adicionales útiles para realizar los procedimientos descritos en el presente documento. Como ejemplo, el kit puede comprender fluidos (por ejemplo tampón SSC) adecuados para hibridar ácidos nucleicos complementarios o para unir un anticuerpo con una proteína con la que se une específicamente, uno más compartimentos de muestra, un material de instrucciones que describe la realización del procedimiento, una muestra de células del sistema de colon normal, una muestra de células de enfermedad relacionada con cáncer de colon y similares.

Procedimiento para producir anticuerpos

También se proporciona en el presente documento un procedimiento para realizar un hibridoma aislado que produce un anticuerpo útil para evaluar si un paciente está aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon. En este procedimiento, se sintetiza o se aísla una proteína o péptido que comprende la totalidad o un segmento de una proteína marcadora (por ejemplo por purificación de una célula en la que se expresa o por transfección y traducción de un ácido nucleico que codifica la proteína o péptido *in vivo* o *in vitro*). Se inmuniza a un vertebrado, por ejemplo, un mamífero tal como un ratón, rata, conejo u oveja usando la proteína o el péptido. El vertebrado puede opcionalmente (y preferentemente) inmunizarse una vez adicional con la proteína o péptido, de modo que el vertebrado muestre una respuesta inmunitaria robusta a la proteína o péptido. Se aíslan esplenocitos del vertebrado inmunizado y se fusionan con una línea celular inmortalizada para formar hibridomas, usando cualquiera de una diversidad de procedimientos. Los hibridomas formados de esta manera se exploran después usando procedimientos convencionales para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente con la proteína marcadora o un fragmento de la misma. También se proporcionan en el presente documento hibridomas realizados por este procedimiento y anticuerpos realizados usando dichos hibridomas.

Procedimiento para evaluar la eficacia

También se proporciona en el presente documento un procedimiento para evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo para inhibir células de enfermedad relacionada con cáncer de colon. Como se ha descrito anteriormente, las diferencias en el nivel de expresión de los marcadores se correlaciona con el estado anómalo de células del sistema de colon. Aunque se reconoce que los cambios en los niveles de expresión de algunos de los marcadores probablemente resultan del estado anómalo de las células de sistema de colon, probablemente se reconozca que los cambios de los niveles de expresión de otro de los marcadores inducen, mantienen y promueven el estado anómalo de esas células. Por lo tanto, los compuestos que inhiben una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente provocarán que el nivel de expresión de uno o más de los marcadores cambie a un nivel más cercano al nivel normal de expresión para ese marcador (es decir el nivel de expresión para el marcador en células

del sistema de colon normal).

Este procedimiento comprende por lo tanto comparar la expresión de un marcador en una primera muestra de célula de colon y mantenida en presencia del compuesto de ensayo y expresión del marcador en una segunda muestra de célula de colon y mantenida en ausencia del compuesto de ensayo. Una expresión reducida significativamente de un marcador en presencia del compuesto de ensayo es un indicio de que el compuesto de ensayo inhibe una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Las muestras de células de colon pueden, por ejemplo, ser alícuotas de una única muestra de células de colon normales obtenidas de un paciente, muestras agrupadas de células de colon normales obtenidas de un paciente, células de una línea celular de colon normal, alícuotas de una única muestra de células de enfermedad relacionada con cáncer de colon obtenidas de un paciente, muestras agrupadas de células de enfermedad relacionada con cáncer de colon obtenidas de un paciente, células de una línea celular de enfermedad relacionada con cáncer de colon o similares.

En una realización, las muestras son células de enfermedad relacionada con cáncer de colon obtenidas de un paciente y se ensayan una pluralidad de compuestos que se cree que son eficaces para inhibir diversas enfermedades relacionadas con cáncer de colon para identificar el compuesto que probablemente inhiba mejor la enfermedad relacionada con cáncer de colon en el paciente.

Este procedimiento puede usarse de forma similar para evaluar la eficacia de una terapia para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente. En este procedimiento, se evalúa el nivel de expresión de uno o más marcadores en un par de muestras (una sometida a terapia, la otra no sometida a la terapia). Como con el procedimiento para evaluar la eficacia de compuestos de ensayo, si la terapia induce un nivel de expresión significativamente menor de un marcador entonces la terapia es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Como anteriormente, si se usan en este procedimiento muestras de un paciente seleccionado, entonces pueden evaluarse terapias alternativas *in vitro* para seleccionar una terapia que sea más probablemente eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el paciente.

Como se ha descrito en el presente documento, el estado anómalo de células de colon humano se correlaciona con cambios en los niveles de expresión de los marcadores. También se proporciona un procedimiento para evaluar el potencial perjudicial de un compuesto de ensayo. Este procedimiento comprende mantener alícuotas separadas de células de colon humanas en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Se compara la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas. Un nivel de expresión significativamente mayor de un marcador en la alícuota mantenido en presencia del compuesto de ensayo (en relación con la alícuota mantenida en ausencia del compuesto de ensayo) es un indicio de que el compuesto de ensayo posee un potencial perjudicial. El potencial perjudicial relativo de diversos compuestos de ensayo puede evaluarse comparando el grado de potenciación o inhibición del nivel de expresión de los marcadores relevantes, comparando el número de marcadores con el que el nivel de expresión se potencia o inhibe, o comparando ambos.

Se describen diversos aspectos en más detalle en las siguientes subsecciones.

Proteínas y anticuerpos aislados

Un aspecto concierne a proteínas marcadoras aisladas y partes biológicamente activas de las mismas, así como fragmentos polipeptídicos adecuados para su uso como inmunógenos para inducir anticuerpos dirigidos contra una proteína marcadora o un fragmento de la misma. En una realización, la proteína marcadora nativa puede aislarse de células o fuentes tisulares por un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación proteica convencionales. En otra realización, una proteína o péptido que comprende la proteína marcadora completa o un segmento de ella se produce por técnicas de ADN recombinante. Como alternativa a expresión recombinante, dicha proteína o péptido puede sintetizarse químicamente usando técnicas de síntesis peptídica convencionales.

Una proteína “aislada” o “purificada” o parte biológicamente activa de la misma está sustancialmente sin material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente tisular de la que deriva la proteína, o sustancialmente sin precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión “sustancialmente sin material celular” incluye preparaciones de proteína en las que la proteína se separa de componentes celulares de las células de las que está aislada o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, la proteína que está sustancialmente sin material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en el presente documento “proteína contaminante”).

Cuando la proteína o parte biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, también está preferentemente sustancialmente sin medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, 10 %, o 5 % del volumen de la preparación proteica. Cuando la proteína se produce por síntesis química, está preferentemente sustancialmente sin precursores químicos u otros compuestos químicos, es decir, está separada de precursores químicos u otros compuestos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En consecuencia dichas preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) de precursores proteicos o compuestos distintos del polipéptido de interés.

Las partes biológicamente activas de una proteína marcadora incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de

aminoácidos suficientemente idénticas a o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora, que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa, y muestran al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Normalmente, las partes biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Una parte biológicamente activa de una proteína marcadora puede ser un polipéptido que es, por ejemplo, de 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud. Además, otras partes biológicamente activas, en las que se suprimen otras regiones de la proteína marcadora, pueden prepararse por técnicas recombinantes y evaluarse con respecto a una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de la proteína marcadora. En ciertas realizaciones, las proteínas útiles son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos aproximadamente el 40 %, y en ciertas realizaciones, el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %) a una de estas secuencias y conservan la actividad funcional de la proteína marcadora de origen natural correspondiente pero difieren en secuencia de aminoácidos debido a variación alélica natural o mutagénesis.

Además, pueden usarse bibliotecas de segmentos de una proteína marcadora para generar una población abigarrada de polipéptidos para exploración y posterior selección de proteínas marcadoras variantes o segmentos de las mismas.

Medicina predictiva

También se proporcionan en el presente documento usos de los modelos animales y marcadores en el campo de la medicina predictiva en los que se usan ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, farmacogenómica y supervisión de ensayos clínicos para fines de pronóstico (predictivos) para tratar de este modo a un individuo de forma profiláctica. En consecuencia, también se proporcionan en el presente documento ensayos de diagnóstico para determinar el nivel de expresión de una o más proteínas marcadoras o ácidos nucleicos, para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Dichos ensayos pueden usarse para fines de pronóstico o predictivos para tratar de forma profiláctica de este modo a un individuo antes de la aparición de la enfermedad relacionada con cáncer de colon.

En otro aspecto, los procedimientos son útiles para al menos exploración periódica del mismo individuo para ver si ese individuo se ha expuesto a compuestos químicos o toxinas que cambian sus patrones de expresión.

Otro aspecto más concierne a la supervisión de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos u otros compuestos administrados para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon o para tratar o prevenir cualquier otro trastorno (por ejemplo, para entender cualquier efecto del sistema que pueda tener dicho tratamiento) en la expresión o actividad de un marcador en ensayos clínicos.

Farmacogenómica

Los marcadores también son útiles como marcadores farmacogenómicos. Como se usa en el presente documento, un "marcador farmacogenómico" es un marcador bioquímico objetivo cuyo nivel de expresión se correlaciona con una respuesta farmacológica clínica específica o susceptibilidad en un paciente. La presencia o cantidad de la expresión del marcador farmacogenómico está relacionada con la respuesta predicha del paciente y más particularmente el tumor del paciente a terapia con un fármaco o clase de fármacos específico. Evaluando la presencia o cantidad de la expresión de uno o más marcadores farmacogenómicos en un paciente, puede seleccionarse una terapia farmacológica que es más apropiada para el paciente, o que se predice que tiene un mayor grado de éxito.

Supervisión de ensayos clínicos

La supervisión de la influencia de agentes (por ejemplo, compuestos farmacológicos) sobre el nivel de expresión de un marcador puede aplicarse no solamente en exploración farmacológica básica, sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente para afectar a la expresión del marcador puede supervisarse en ensayos clínicos de sujetos que reciben tratamiento para una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

En una realización no limitante, la presente invención proporciona un procedimiento para supervisar la eficacia de tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro candidato farmacológico) que comprende las etapas de (i) obtener una muestra preadministración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de uno o más marcadores seleccionados en la muestra preadministración; (iii) obtener una o más muestras postadministración del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión del marcador o los marcadores en las muestras postadministración; (v) comparar el nivel de expresión del marcador o los marcadores en la muestra preadministración con el nivel de expresión de los marcadores en la muestra o las muestras postadministración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto en consecuencia.

Por ejemplo, la expresión aumentada del gen o los genes marcadores durante el transcurso del tratamiento puede indicar dosificación ineficaz y la conveniencia de aumentar la dosificación. Por el contrario, la expresión reducida del gen o los genes marcadores puede indicar tratamiento eficaz y ausencia de necesidad de cambiar la dosificación.

Medios leíbles en aparatos electrónicos, sistemas, matrices y procedimientos de uso de los mismos

Como se usa en el presente documento, “medios leíbles por aparato electrónico” se refiere a cualquier medio adecuado para almacenar, mantener o contener datos o información que puede leerse y a la que puede accederse directamente mediante un aparato electrónico. Dichos medios pueden incluir, pero sin limitación: medios de almacenamiento magnéticos, tales como disquetes, medios de almacenamiento de disco duro, y cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tales como disco compacto; medios de almacenamiento electrónicos tales como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares; y discos duros generales e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos. El medio se adapta o se configura para que se registre en el mismo un marcador como se ha descrito en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión “aparato electrónico” pretende incluir cualquier aparato de procesamiento o computación adecuado u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Los ejemplos de aparatos electrónicos adecuados para su uso con la presente invención incluyen aparatos informáticos autónomos; redes, incluyendo una red de área local (LAN), una red de área amplia (WAN), Internet, Intranet y Extranet; aparatos electrónicos tales como asistentes digitales personales (PDA), teléfonos móviles, localizadores y similares; y sistemas de procesamiento locales y distribuidos.

Como se usa en el presente documento “registrado” se refiere a un procedimiento para almacenar o codificar información en el medio leíble por aparato electrónico. Los expertos en la materia pueden adoptar fácilmente cualquier procedimiento para registrar información en los medios para generar materiales que comprenden los marcadores descritos en el presente documento.

Pueden usarse una diversidad de programas informáticos y formatos para almacenar la información del marcador de la presente invención en el medio leíble por aparato electrónico. Puede emplearse cualquier variedad de formatos de estructuración de procesadores de datos (por ejemplo, archivo de texto o base de datos) para obtener o crear un medio que tenga registrado en el mismo los marcadores. Proporcionando los marcadores en forma leíble, se puede acceder de forma rutinaria a la información de secuencia del marcador para una diversidad de fines. Por ejemplo, un experto en la materia puede usar las secuencias de nucleótidos o aminoácidos en forma leíble para comparar una secuencia diana o motivo estructural diana con la información de secuencia almacenada dentro del medio de almacenamiento de datos. Se usan medios de búsqueda para identificar fragmentos o regiones de las secuencias que coinciden con una secuencia diana particular o motivo diana.

Por lo tanto, también se proporciona en el presente documento un medio para mantener instrucciones para realizar un procedimiento para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con cáncer de colon, en el que el procedimiento comprende las etapas de determinar la presencia o ausencia de un marcador y basándose en la presencia o ausencia del marcador, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con cáncer de colon y/o recomendar un tratamiento particular para una enfermedad relacionada con cáncer de colon o afección pre-enfermedad relacionada con cáncer de colon.

También se proporciona en el presente documento un sistema electrónico y/o en una red, un procedimiento para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con cáncer de colon asociada con un marcador en el que el procedimiento comprende las etapas de determinar la presencia o ausencia del marcador, y basándose en la presencia o ausencia del marcador, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con cáncer de colon y/o recomendar un tratamiento particular para la enfermedad relacionada con cáncer de colon o afección pre-enfermedad relacionada con cáncer de colon. El procedimiento puede comprender además la etapa de recibir información fenotípica asociada con el sujeto y/o adquirir de una red información fenotípica asociada con el sujeto.

También se proporciona en el presente documento una red, un procedimiento para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con cáncer de colon asociada con un marcador, comprendiendo el procedimiento las etapas de recibir información asociada con el marcador, recibir información fenotípica asociada con el sujeto, adquirir información de la red correspondiente al marcador y/o enfermedad relacionada con cáncer de colon y basándose en uno o más de la información fenotípica, el marcador y la información adquirida, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con cáncer de colon. El procedimiento puede comprender además la etapa de recomendar un tratamiento particular para la enfermedad relacionada con cáncer de colon o afección pre-enfermedad relacionada con cáncer de colon.

También se proporciona en el presente documento un procedimiento de negocio para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con cáncer de colon, comprendiendo el procedimiento las etapas de recibir información asociada con el marcador, recibir información fenotípica asociada con el sujeto, adquirir información de la red correspondiente al marcador y/o una enfermedad relacionada con cáncer de colon, y basándose en uno o más de la información fenotípica, el marcador y la información adquirida, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon o una

predisposición a una enfermedad relacionada con cáncer de colon. El procedimiento puede comprender además la etapa de recomendar un tratamiento particular para la enfermedad relacionada con cáncer de colon o afección pre-enfermedad relacionada con cáncer de colon.

5 También se proporciona en el presente documento una matriz que puede usarse para ensayar la expresión de uno o más genes en la matriz. En una realización, la matriz puede usarse para ensayar la expresión génica en un tejido para determinar la especificidad tisular de genes en la matriz. De esta manera, pueden ensayarse simultáneamente hasta aproximadamente 7000 o más genes con respecto a expresión. Esto permite que se desarrolle un perfil que muestra una batería de genes expresados específicamente en uno o más tejidos.

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

15 Dicha determinación es útil, por ejemplo, para conocer el efecto de interacción célula-célula al nivel de la expresión génica. Si se administra un agente terapéuticamente para tratar un tipo celular pero tiene un efecto indeseable en otro tipo celular, el procedimiento proporciona un ensayo para determinar la base molecular del efecto indeseable y por lo tanto proporciona la oportunidad de coadministrar un agente compensatorio o tratar de otro modo el efecto no deseado. De forma similar, incluso dentro de un único tipo celular, pueden determinarse efectos biológicos indeseables al nivel molecular. Por lo tanto, los efectos de un agente sobre la expresión de un gen distinto del diana pueden determinarse y contrarrestarse.

20 En otra realización, la matriz puede usarse para supervisar el recorrido de la expresión en el tiempo de uno o más genes en la matriz. Esto puede realizarse en diversos contextos biológicos, como se desvela en el presente documento, por ejemplo desarrollo de una enfermedad relacionada con cáncer de colon, progresión de una enfermedad relacionada con cáncer de colon y procesos, tales como transformación celular asociada con una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

25 La matriz también es útil para determinar el efecto de la expresión de un gen o la expresión de otros genes en la misma célula o en diferentes células. Esto posibilita, por ejemplo, una selección de dianas moleculares alternativas para intervención terapéutica si no puede regularse la última diana o corriente abajo.

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

Marcadores sustitutos

35 Los marcadores pueden actuar como marcadores sustitutos para uno o más trastornos o patologías o para afecciones que conducen a una patología relacionada con cáncer de colon. Como se usa en el presente documento, un "marcador sustituto" es un marcador bioquímico objetivo que se correlaciona con la ausencia o presencia de una enfermedad o trastorno, o con la progresión de una enfermedad o trastorno. La presencia o cantidad de dichos marcadores es independiente de la enfermedad. Por lo tanto, estos marcadores pueden actuar para indicar si un curso de tratamiento particular es eficaz para reducir una patología o trastorno. Los marcadores sustitutos son particularmente útiles cuando la presencia o grado de una patología o trastorno es difícil de evaluar mediante metodologías convencionales, o cuando se desea una evaluación de progresión de enfermedad antes de que se alcance un punto final clínico potencialmente peligroso.

40 Los marcadores también son útiles como marcadores farmacodinámicos. Como se usa en el presente documento, un "marcador farmacodinámico" es un marcador bioquímico objetivo que se correlaciona específicamente con efectos farmacológicos. La presencia o cantidad de un marcador farmacodinámico no está relacionada con la patología o trastorno para el que se administra el fármaco; por lo tanto, la presencia o cantidad del marcador es indicativa de la presencia o actividad del fármaco en un sujeto. Por ejemplo, un marcador farmacodinámico puede ser indicativo de la concentración del fármaco en un tejido biológico, porque el marcador se expresa o se transcribe o no se expresa o se transcribe en ese tejido en relación con el nivel del fármaco. De esta manera, la distribución o adaptación del fármaco puede supervisarse por el marcador farmacodinámico. De forma similar, la presencia o cantidad del marcador farmacodinámico puede relacionarse con la presencia o cantidad del producto metabólico de un fármaco, de modo que la presencia o cantidad del marcador es indicativa de la tasa de degradación relativa del fármaco *in vivo*.

55 Los marcadores farmacodinámicos son particularmente útiles para aumentar la sensibilidad de detección de efectos farmacológicos, particularmente cuando el fármaco se administra en dosis bajas. Puesto que incluso una cantidad pequeña de un fármaco puede ser suficiente para activar múltiples ciclos de transcripción o expresión de marcador, el marcador amplificado puede estar en una cantidad que es más fácilmente detectable que el fármaco en sí mismo.

Además, el marcador puede detectarse más fácilmente debido a la naturaleza del marcador en sí mismo; por ejemplo, usando los procedimientos descritos en el presente documento, pueden emplearse anticuerpos en un sistema de detección basado en el sistema inmunitario para un marcador proteico o pueden usarse sondas radiomarcadas específicas de marcador para detectar un marcador de ARNm. Además, el uso de un marcador farmacodinámico puede ofrecer predicción de riesgo basada en mecanismo debido a tratamiento farmacológico más allá del intervalo de observaciones directas posibles.

Protocolos para ensayar

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

Cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento y el nivel de expresión se expresa diferencialmente (por ejemplo, es mayor o menor que en el control), se considera que el sujeto está afectado por una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Cuando el nivel de expresión del gen marcador queda dentro del intervalo permisible, es poco probable que el sujeto esté afectado por una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

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

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

La medición de los niveles de expresión de genes marcadores en el ensayo con respecto a una enfermedad relacionada con cáncer de colon puede llevarse a cabo según diversos procedimientos de análisis génico. Específicamente, se puede usar, por ejemplo, una técnica de hibridación que usa ácidos nucleicos que hibridan con estos genes como sondas, o una técnica de amplificación génica que usa ADN que hibrida con los genes marcadores como cebadores.

Las sondas o cebadores usados para los ensayos pueden diseñarse basándose en las secuencias de nucleótidos de los genes marcadores. Los números de identificación para las secuencias de nucleótidos de los genes marcadores respectivos se describen en el presente documento.

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

Debe entenderse también que los genes marcadores pueden incluir homólogos de otras especies además de seres humanos. Por lo tanto, a no ser que se especifique de otro modo, la expresión "gen marcador" se refiere a un homólogo del gen marcador único de la especie o un gen marcador ajeno que se ha introducido en un individuo.

Además, debe entenderse que un "homólogo de un gen marcador" se refiere a un gen derivado de una especie distinta de un ser humano, que puede hibridar con el gen marcador humano como una sonda en condiciones rigurosas. Dichas condiciones rigurosas se conocen por los expertos en la materia que pueden seleccionar una condición apropiada para producir una rigurosidad igual de forma experimental o empírica.

Un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de un gen marcador o una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la cadena complementaria de la secuencia de nucleótidos de un gen marcador y tiene al menos 15 nucleótidos puede usarse como una sonda o cebador. Por lo tanto, una "cadena complementaria" significa una cadena de un ADN bicatenario con respecto a la otra cadena y que está compuesta de pares de bases A:T (U para ARN) y G:C.

Además, "complementaria" significa no solamente las que son completamente complementarias de una región de al menos 15 nucleótidos continuos, sino también las que tienen una homología de secuencia de nucleótidos de al menos el 40 % en ciertos casos, el 50 % en ciertos casos, el 60 % en ciertos casos, el 70 % en ciertos casos, al menos el 80 %, 90 % y 95 % o más. El grado de homología entre secuencias de nucleótidos puede determinarse por

un algoritmo, BLAST, etc.

Dichos polinucleótidos son útiles como una sonda para detectar un gen marcador, o como un cebador para amplificar un gen marcador. Cuando se usa como un cebador, el polinucleótido comprende habitualmente de 15 pb a 100 pb, y en ciertas realizaciones, de 15 pb a 35 pb de nucleótidos. Cuando se usa como una sonda, un ADN comprende la secuencia de nucleótidos completa del gen marcador (o la cadena complementaria de la misma), o una secuencia parcial de la misma que tiene al menos 15 pb de nucleótidos. Cuando se usa como un cebador, la región 3' debe ser complementaria del gen marcador, mientras que la región 5' puede estar ligada a una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción o un marcador.

"Polinucleótidos" pueden ser ADN o ARN. Estos polinucleótidos pueden ser sintéticos o de origen natural. Además, el ADN usado como una sonda para hibridación habitualmente está marcado. Los expertos en la materia entienden fácilmente dichos procedimientos de marcaje. Por lo tanto, el término "oligonucleótido" significa un polinucleótido con un grado relativamente bajo de polimerización. Se incluyen oligonucleótidos en polinucleótidos.

Pueden realizarse ensayos para una enfermedad relacionada con cáncer de colon usando técnicas de hibridación, por ejemplo, hibridación de Northern, hibridación de transferencia puntual o la técnica de micromatrices de ADN. Además, pueden usarse técnicas de amplificación génica, tales como el procedimiento de RT-PCR. Usando el procedimiento de supervisión de amplificación por PCR durante la etapa de amplificación génica en RT-PCR, se puede conseguir un análisis más cuantitativo de la expresión de un gen marcador.

En el procedimiento de supervisión de amplificación génica por PCR, la diana de detección (ADN o transcrito inverso de ARN) se hibrida con sondas que están marcadas con un colorante fluorescente y un interruptor que absorbe la fluorescencia. Cuando se realiza la PCR y la Taq polimerasa degrada la sonda con su actividad 5'-3' exonucleasa, el colorante fluorescente y el interruptor se separan entre sí y se detecta la fluorescencia. La fluorescencia se detecta en tiempo real. Midiendo simultáneamente una muestra convencional en la que se conoce el número de copias de una diana, es posible determinar el número de copias de la diana en la muestra del sujeto con el número de ciclo en el que la amplificación por PCR es lineal. Además, un experto en la materia reconoce que el procedimiento de supervisión de amplificación por PCR puede llevarse a cabo usando cualquier procedimiento adecuado.

El procedimiento de ensayos para detectar una enfermedad relacionada con cáncer de colon también puede llevarse a cabo detectando una proteína codificada por un gen marcador. En lo sucesivo en el presente documento, una proteína codificada por un gen marcador se describe como una "proteína marcadora". Para dichos procedimientos de ensayo, por ejemplo, el procedimiento de transferencia de Western, el procedimiento de inmunoprecipitación y el procedimiento de ELISA pueden emplearse usando un anticuerpo que se une a cada proteína marcadora.

Los anticuerpos usados en la detección que se unen a la proteína marcadora pueden producirse por cualquier técnica adecuada. Además, para detectar una proteína marcadora, dicho anticuerpo puede estar marcado de forma apropiada. Como alternativa, en lugar de marcar el anticuerpo, puede marcarse una sustancia que se une específicamente al anticuerpo, por ejemplo, proteína A o proteína G para detectar la proteína marcadora indirectamente. Más específicamente, dicho procedimiento de detección puede incluir el procedimiento de ELISA.

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

Además, puede realizarse un ensayo con respecto a una enfermedad relacionada con cáncer de colon usando como un índice no solamente el nivel de expresión de un gen marcador sino también la actividad de una proteína marcadora en una muestra biológica. La actividad de una proteína marcadora significa la actividad biológica intrínseca a la proteína. Pueden usarse diversos procedimientos para medir la actividad de cada proteína.

Incluso si no se diagnostica a un paciente que está aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un ensayo rutinario a pesar de síntomas que sugieren estas enfermedades, puede determinarse fácilmente sin dicho paciente padece o no una enfermedad relacionada con cáncer de colon realizando un ensayo de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

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

Además, los ensayos son útiles para determinar si una enfermedad relacionada con cáncer de colon está mejorando en un paciente. En otras palabras, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para considerar el efecto terapéutico de un tratamiento para una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Además,

cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento, un aumento o reducción en el nivel de expresión del gen marcador en un paciente, al que se ha diagnosticado que está aquejado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon, implica que la enfermedad ha progresado más.

- 5 La gravedad y/o susceptibilidad a una enfermedad relacionada con cáncer de colon también puede determinarse basándose en la diferencia en los niveles de expresión. Por ejemplo, cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento, el grado de aumento en el nivel de expresión del gen marcador está correlacionado con la presencia y/o gravedad de una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

Modelos animales

- 10 En otro aspecto, se proporcionan en el presente documento modelos animales para una enfermedad relacionada con cáncer de colon, en los que el nivel de expresión de uno o más genes marcadores o un gen funcionalmente equivalente al gen marcador se ha elevado en el modelo animal. Un "gen funcionalmente equivalente" como se usa en el presente documento generalmente es un gen que codifica una proteína que tiene una actividad similar a una actividad conocida de una proteína codificada por el gen marcador. Un ejemplo representativo de un gen funcionalmente equivalente incluye un homólogo de un gen marcador de un sujeto animal, que es intrínseco al animal.

El modelo animal para una enfermedad relacionada con cáncer de colon es útil para detectar cambios fisiológicos debido a una enfermedad relacionada con cáncer de colon. En ciertas realizaciones, los modelos animales son útiles para revelar funciones adicionales de genes marcadores y para evaluar fármacos cuyas dianas son los genes marcadores.

- 20 En una realización, un modelo animal para una enfermedad relacionada con cáncer de colon puede crearse controlando el nivel de expresión de un gen homólogo o administrando un gen homólogo. El procedimiento puede incluir crear un modelo animal para una enfermedad relacionada con cáncer de colon controlando el nivel de expresión de un gen seleccionado del grupo de genes descrito en el presente documento. En otra realización, el procedimiento puede incluir crear un modelo animal para una enfermedad relacionada con cáncer de colon administrando la proteína codificada por un gen descrito en el presente documento, o administrando un anticuerpo contra la proteína. También debe entenderse que en ciertas otras realizaciones el marcador puede sobreexpresarse de modo que el marcador pueda después medirse usando procedimientos apropiados.

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

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

- 35 El modelo animal es útil para dilucidar el mecanismo que subyace a una enfermedad relacionada con cáncer de colon y también para ensayar la seguridad de compuestos obtenidos por exploración. Por ejemplo, cuando un modelo animal desarrolla los síntomas de enfermedad relacionada con cáncer de colon, o cuando un valor medido implicado en cierta enfermedad relacionada con cáncer de colon se altera en el animal, puede construirse un sistema de exploración para explorar compuestos que tienen actividad para aliviar la enfermedad.

- 40 Como se usa en el presente documento, la expresión "un aumento en el nivel de expresión" se refiere a uno cualquiera de los siguientes: cuando un gen marcador introducido como un gen ajeno se expresa artificialmente; cuando la transcripción de un gen marcador intrínseco al sujeto animal y la traducción del mismo a la proteína están potenciados; o cuando la hidrólisis de la proteína, que es el producto de traducción, está suprimida. Como se usa en el presente documento, la expresión "una reducción en el nivel de expresión" se refiere al estado en el que la transición de un gen marcador del sujeto animal y la traducción del mismo en la proteína están inhibidas, o el estado en el que la hidrólisis de la proteína, que es el producto de traducción, está potenciada. El nivel de expresión de un gen puede determinarse, por ejemplo, por una diferencia en la intensidad de señal en una microplaca de ADN. Además, la actividad del producto de traducción, la proteína, puede determinarse comparando con la del estado normal.

- 50 También está dentro del alcance contemplado que el modelo animal pueda incluir animales transgénicos, incluyendo, por ejemplo, animales en los que se ha introducido un gen marcador y se ha expresado de forma artificial; animales knockout para gen marcador; y animales knock-in en los que otro gen ha sustituido a un gen marcador. Puede usarse un animal transgénico, en el que se ha introducido un ácido nucleico antisentido de un gen marcador, una ribozima, un polinucleótido que tiene un efecto de ARNi, o un ADN que actúa como un ácido nucleico señuelo o similares, como el animal transgénico. Dichos animales transgénicos también incluyen, por ejemplo, animales en los que se ha potenciado o suprimido la actividad de una proteína marcadora introduciendo una mutación o mutaciones en la región codificante del gen, o la secuencia de aminoácidos se ha modificado para hacerse resistente o susceptible a hidrólisis. Las mutaciones en una secuencia de aminoácidos incluyen

sustituciones, deleciones, inserciones y adiciones.

Además, la propia expresión de un gen marcador puede controlarse introduciendo una mutación o mutaciones en la región reguladora de la transcripción del gen. Los expertos en la materia entienden dichas sustituciones de aminoácidos. Además, el número de aminoácidos que se mutan no está particularmente restringido, siempre que se mantenga la actividad. Normalmente, está dentro de 50 aminoácidos, en ciertas realizaciones no limitantes, dentro de 30 aminoácidos, dentro de 10 aminoácidos o dentro de 3 aminoácidos. El sitio de mutación puede ser cualquier sitio, siempre que se mantenga la actividad.

En otro aspecto más, se proporcionan en el presente documento procedimientos de exploración con respecto a compuestos candidatos para agentes terapéuticos para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Se seleccionan uno o más genes marcadores del grupo de genes descritos en el presente documento. Puede obtenerse un agente terapéutico para una enfermedad relacionada con cáncer de colon seleccionando un compuesto capaz de aumentar o reducir el nivel de expresión del gen o los genes marcadores.

Debe entenderse que la expresión "un compuesto que aumenta el nivel de expresión de un gen" se refiere a un compuesto que promueve una cualquiera de las etapas de transcripción génica, traducción génica o expresión de una actividad proteica. Por otro lado, la expresión "un compuesto que reduce el nivel de expresión de un gen", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que inhibe una cualquiera de estas etapas.

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

En otro aspecto más, se proporciona en el presente documento un procedimiento para evaluar la eficacia de un compuesto candidato para un agente farmacéutico en el nivel de expresión de un gen o genes marcadores poniendo en contacto un sujeto animal con el compuesto candidato y supervisando el efecto del compuesto en el nivel de expresión del gen o genes marcadores en una muestra biológica derivada del sujeto animal. La variación en el nivel de expresión del gen o genes marcadores en una muestra biológica derivada del sujeto animal puede supervisarse usando la misma técnica que se usa en el procedimiento de ensayo descrito anteriormente. Además, basándose en la evaluación, puede seleccionarse un compuesto candidato para un agente farmacéutico mediante exploración.

Los procedimientos y reactivos descritos en el presente documento son representativos de realizaciones preferidas, son ejemplares y no se pretende que sean limitaciones sobre el alcance de la invención. Los expertos en la materia encontrarán modificaciones de los mismos y otros usos. También resultará fácilmente evidente para un experto en la materia que pueden realizarse diversas sustituciones y modificaciones a la invención desvelada en el presente documento sin alejarse del alcance y espíritu de la invención.

Debería entenderse que aunque la presente invención se ha desvelado específicamente por realizaciones preferidas y características opcionales, puede recurrirse a modificaciones y variaciones de los conceptos desvelados en el presente documento por los expertos en la materia, y que dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Referencias para el ejemplo 1

1. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, y col. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon Oxford: IARC Press; 2000: 104-19.

2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 2007; 57(1): 43-66.

3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61(5): 759-67.

4. Goldman E, Fisher JL. Discrepancies in cancer mortality estimates. Arch Med Res 2006;37(4):548-51.

5. Rodriguez-Bigas MA, Hoff P, Crane CH. Carcinoma of the Colon and Rectum. In: Kufe DW, Bast RC, Hait WN, y col., eds. Holland-Frei Cancer Medicine 7. 7ª ed. Hamilton, Ont: BC Decker Inc; 2006: 1369-9.

6. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2006; 6(11): 857-66.

7. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, y col. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2005; 353(17): 1793-801.

8. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, y col. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 2006; 9(3): 189-98.

9. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
10. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
- 5 11. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75(5): 855-62.
12. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 2003; 113(0): 25-36.
- 10 13. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65(14): 6029-33.
14. Xu P, Vemooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA *Mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 2003; 13(9): 790-5.
15. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303(5654): 83-6.
16. He L, Thomson JM, Hemann MT, y col. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435 (7043): 828-33.
17. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 259-69.
- 20 18. Lu J, Getz G, Miska EA, y col. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-8.
19. Volinia S, Calin GA, Liu CG, y col. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(7): 2257-61.
20. Cummins JM, He Y, Leary RJ, y col. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(10): 3687-92.
- 25 21. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, y col. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006;5:29.
22. Michael MZ, SM OC, van Hoist Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific micro-RNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1(12): 882-91.
- 30 23. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, y col. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(24): 155224-9.
24. Dews M, Homayouni A, Yu D, y col. Augmentation of tumor angiogenesis by a *Myc*-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 2006; 38(9): 1060-5.
- 35 25. Wang CL, Wang BB, Bartha G, y col. Activation of an oncogenic microRNA cistron by provirus Integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(49): 18680-4.
26. Georgantas RW, 3rd, Hildreth R, Morisot S, y col. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(8): 2750-5.
- 40 27. Chen Y, Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* 2007; 67(3): 976-83.
28. Wurdinger T, Costa FF. Molecular therapy in the microRNA era. *Pharmacogenomics J* 2006.
29. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, y col. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438 (7068): 685-9.
- 45 30. Liu CG, Calin GA, Meloon B, y col. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(26): 9740-4.
31. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2005; 48(6): 11618.

32. Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 2004; 339(2): 327-35.
33. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, y col. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65(21): 9628-32.
34. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, y col. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7065-70.
35. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007; 26(19): 2799-803.
36. Meng F, Henson R, Lang M, y col. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130(7): 2113-29.
37. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 Targets the Tumor Suppressor Gene Tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007; 282(19): 14328-36.
38. Brasens LA, van Hattem WA, Jansen M, de Leng WW, Giardiello FM, Offerhaus GJ. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Curr Mol Med* 2007; 7(1): 29-46.
39. Mattes J, Yang M, Foster PS. Regulation of microRNA by antagomirs: a new class of pharmacological antagonists for the specific regulation of gene function? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(1): 8-12.

Referencias para el ejemplo 2

1. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2006.
2. Bartel, D. P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. 116(2): p. 281-97.
3. Esquela-Kerscher, A. y F. J. Slack, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(4): p. 259-69.
4. Brennecke, J., D. R. Hipfner, A. Stark, R. B. Russell, y S. M. Cohen, bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 2003. 113(1): p. 25-36.
5. Chan, J. A., A. M. Krichevsky, y K. S. Kosik, MicroRNA-21 is an antiapoptotic, factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 6029-33.
6. Xu, P., S. Y. Vernooy, M. Guo, y B. A. Hay, The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal/at metabolism. *Curr Biol*, 2003. 13(9): p. 790-5.
7. Lee, R. C., R. L. Feinbaum, y V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 1993. 75(5): p. 843-54.
8. Wightman, B., I. Ha, y G. Ruvkun, Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993. 75(5): p. 855-62.
9. Chen, C. Z., L. Li, H. F. Lodish, y D. P. Bartel, Micro-RNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004. 303(5654): p. 83-6.
10. He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon, y S. M. Hammond, A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005. 435(7043): p. 828-33.
11. Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, y T. R. Golub, MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005. 435(7043): p. 834-8.
12. Volinia, S., G. A. Calin, C.G. Liu, S. Arabs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris, y C. M. Croce, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006. 103(7): p. 2257-61.
13. Cummins, J. M., Y. He, R. J. Leary, R. Pagliarini, L. A. Diaz, Jr., T. Sjoblom, O. Barad, Z. Bentwich, A. E. Szafranska, E. Labourier, C. K. Raymond, B. S. Roberts, H. Juhl, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, y V. E. Velculescu, The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(10): p. 3687-92.
14. Cahn, G. A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H.

Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, y C. M. Croce, A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2005. 353(17): p. 1793-801.

15. Yanaihara, N., N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R. M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G. A. Calin, C. G. Liu, C. M. Croce, y C. C. Harris, Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006. 9(3): p. 189-98.

16. Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, y M. Stoffel, Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 2005. 438(7068): p. 685-9.

17. Liu, C. G., G. A. Calin, B. Meloan, N. Gamliel, C. Sevignani, M. Ferracin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, S. Zupo, M. Dono, H. Alder, F. Bullrich, M. Negrini, y C. M. Croce, An oligonucleotide microchip, for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(26): p. 9740-4.

18. Iorio, M. V., M. Ferracin, C. G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J. P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G. A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, y C. M. Croce, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(16): p. 7065-70.

19. Cheng, A. M., M. W. Byrom, J. Shelton y L. P. Ford, Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(4): p. 1290-7.

20. Tanzer, A. y P. F. Stadler, Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol*, 2004. 339(2): p. 327-35.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar si un sujeto tiene un adenocarcinoma de colon con pronóstico de supervivencia pobre, que comprende:
 - 5 medir el nivel de al menos un producto génico de miR-106a en una muestra de ensayo del sujeto en donde dicho sujeto tiene un adenocarcinoma de colon,
 - en donde un aumento en al menos el nivel del producto génico de miR-106a en la muestra de ensayo, en relación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control, es indicativo de que el sujeto tiene adenocarcinoma de colon con pronóstico de supervivencia pobre.
- 10 2. Un procedimiento de prueba para adenocarcinoma de colon de pronóstico de supervivencia pobre, que comprende:
 - (1) determinar un nivel de expresión de al menos un marcador en una muestra de un sujeto de ensayo que tiene adenocarcinoma de colon; incluyendo el al menos un marcador al menos un producto génico de miR-106a;
 - 15 (2) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa (1) con un nivel de expresión del marcador en una muestra de un sujeto sano; y
 - (3) considerar que el sujeto tiene un adenocarcinoma de colon de pronóstico de supervivencia pobre cuando el resultado de la comparación en la etapa (2) indica que:

el nivel de expresión del al menos un marcador en el sujeto de ensayo es mayor que el del control.
- 20 3. El procedimiento de ensayo de la reivindicación 2, en el que la muestra comprende uno o más de tejido, sangre, plasma, suero, orina y heces.
4. El procedimiento de ensayo de la reivindicación 2, en el que todas las etapas del procedimiento se realizan *in vitro*.
5. Un procedimiento para diagnosticar si un sujeto tiene adenocarcinoma de colon de pronóstico de supervivencia pobre, que comprende:
 - 25 (1) transcribir de forma inversa ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana en donde dicho sujeto tiene adenocarcinoma de colon;
 - (2) hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miR-106a para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y
 - 30 (3) comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control,
 - en el que un aumento en la señal del miR-106a es indicativa de que el sujeto tiene un adenocarcinoma de colon de pronóstico de supervivencia pobre.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que un nivel de expresión de producto génico de miR-106a se evalúa detectando la presencia de un polinucleótido transcrito o parte del mismo, en el que el polinucleótido transcrito comprende una región codificante de producto génico de miR-106a.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra es un fluido corporal o un tejido asociados con cáncer de colon.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra comprende células obtenidas del paciente.
- 40 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el al menos un producto génico de miR-106a incluye variantes aisladas o fragmentos biológicamente activos de las mismas.
10. Un procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además medir el nivel de al menos un producto génico de miR adicional en la muestra de ensayo, en el que el miR se selecciona del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.
- 45 11. Un procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además medir el nivel de al menos dos o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.
12. Un procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además medir el nivel de al menos tres o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que

consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.

13. Un procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además medir el nivel de al menos un producto génico de miR adicional en la muestra de ensayo, en el que el miR se selecciona del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.

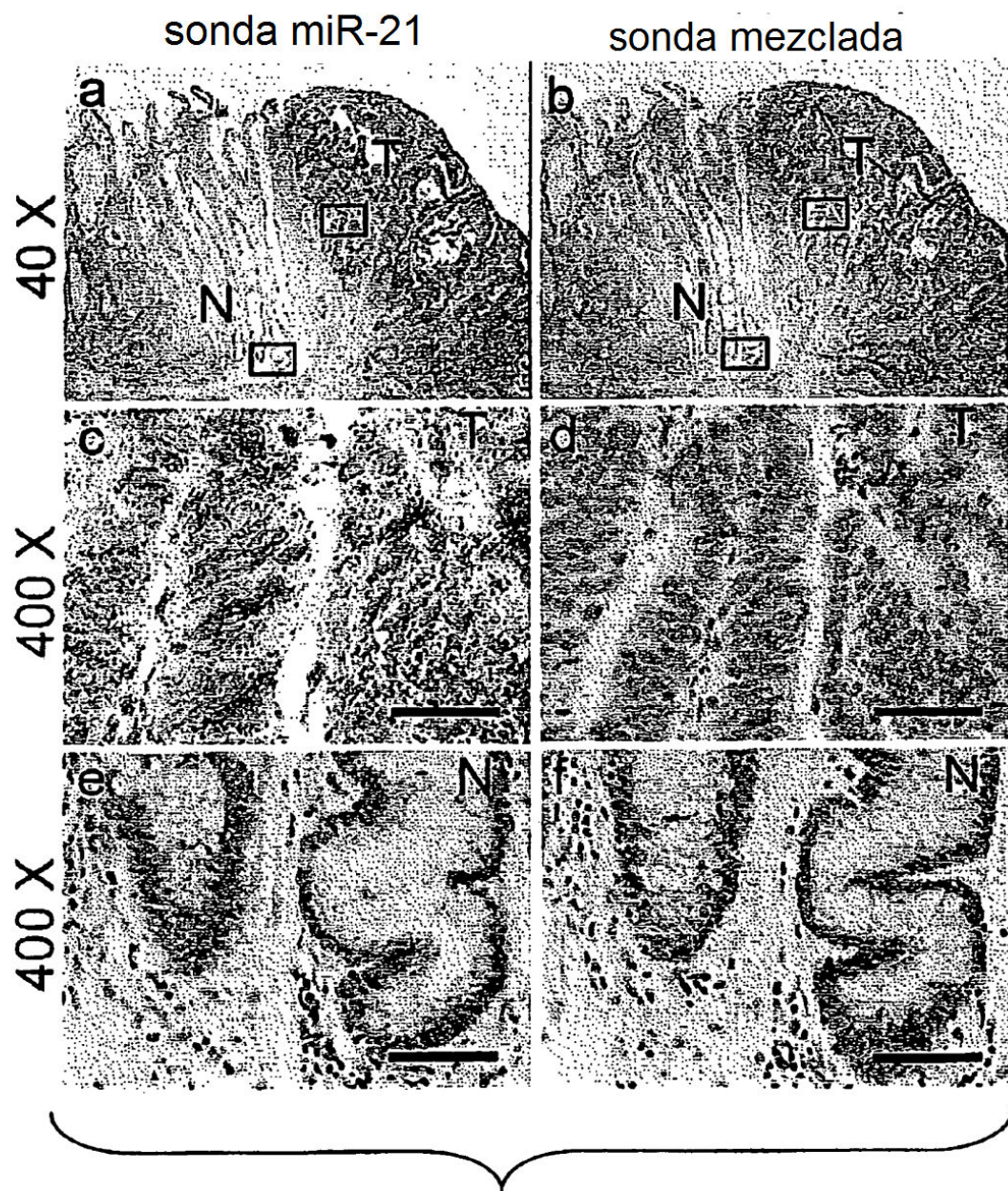
5 14. Un procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además medir el nivel de al menos dos o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.

10 15. Un procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además medir el nivel de al menos tres o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.

16. Un procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además medir el nivel de al menos un producto génico de miR adicional en la muestra de ensayo, en el que el miR se selecciona del grupo que consiste en miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.

15 17. Un procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además medir el nivel de al menos dos o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.

18. Un procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además medir el nivel de al menos tres o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.



Figuras 1a - 1f

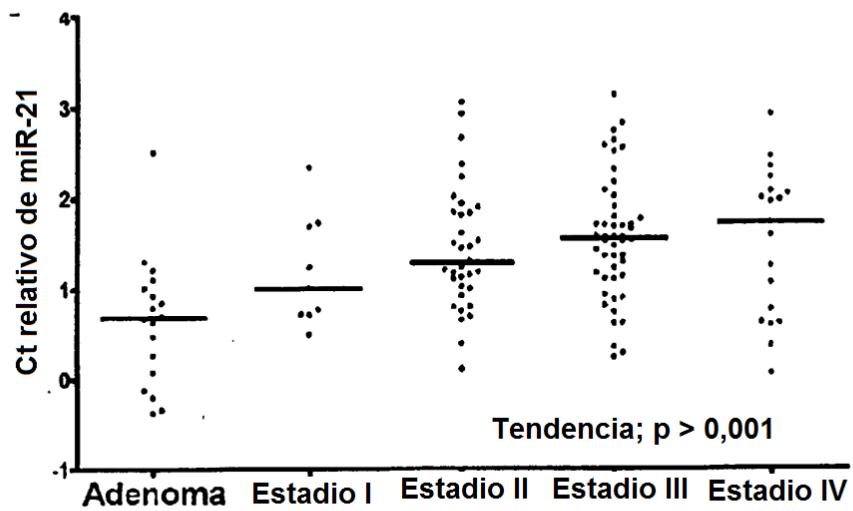


Figura 1g

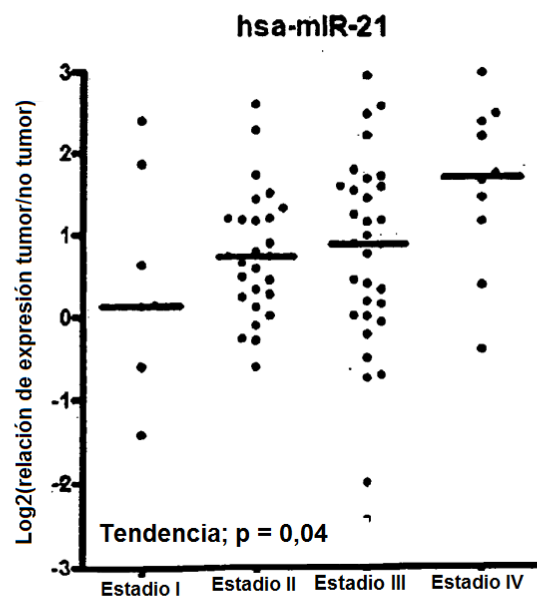


Figura 2

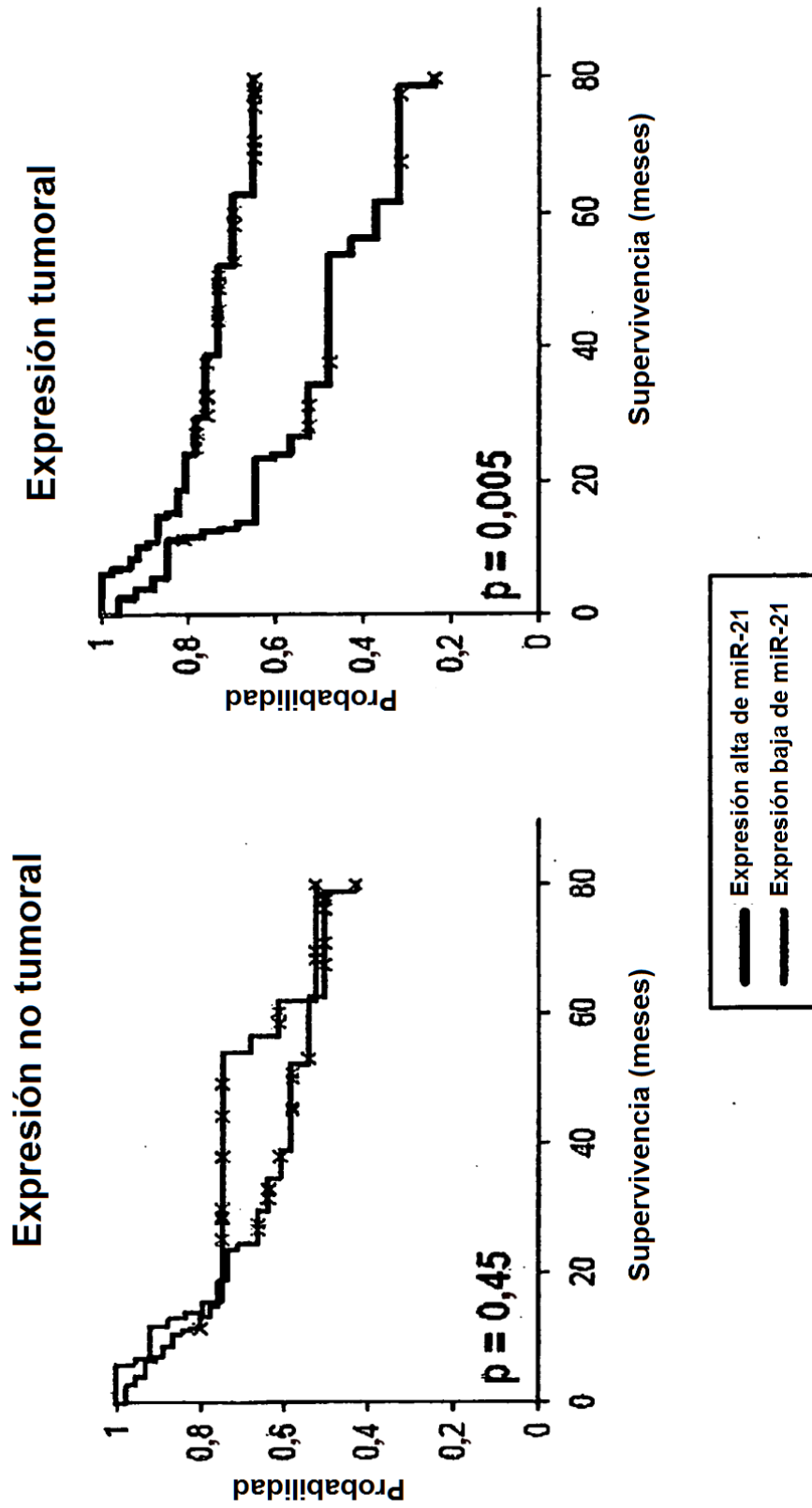


Figura 3a

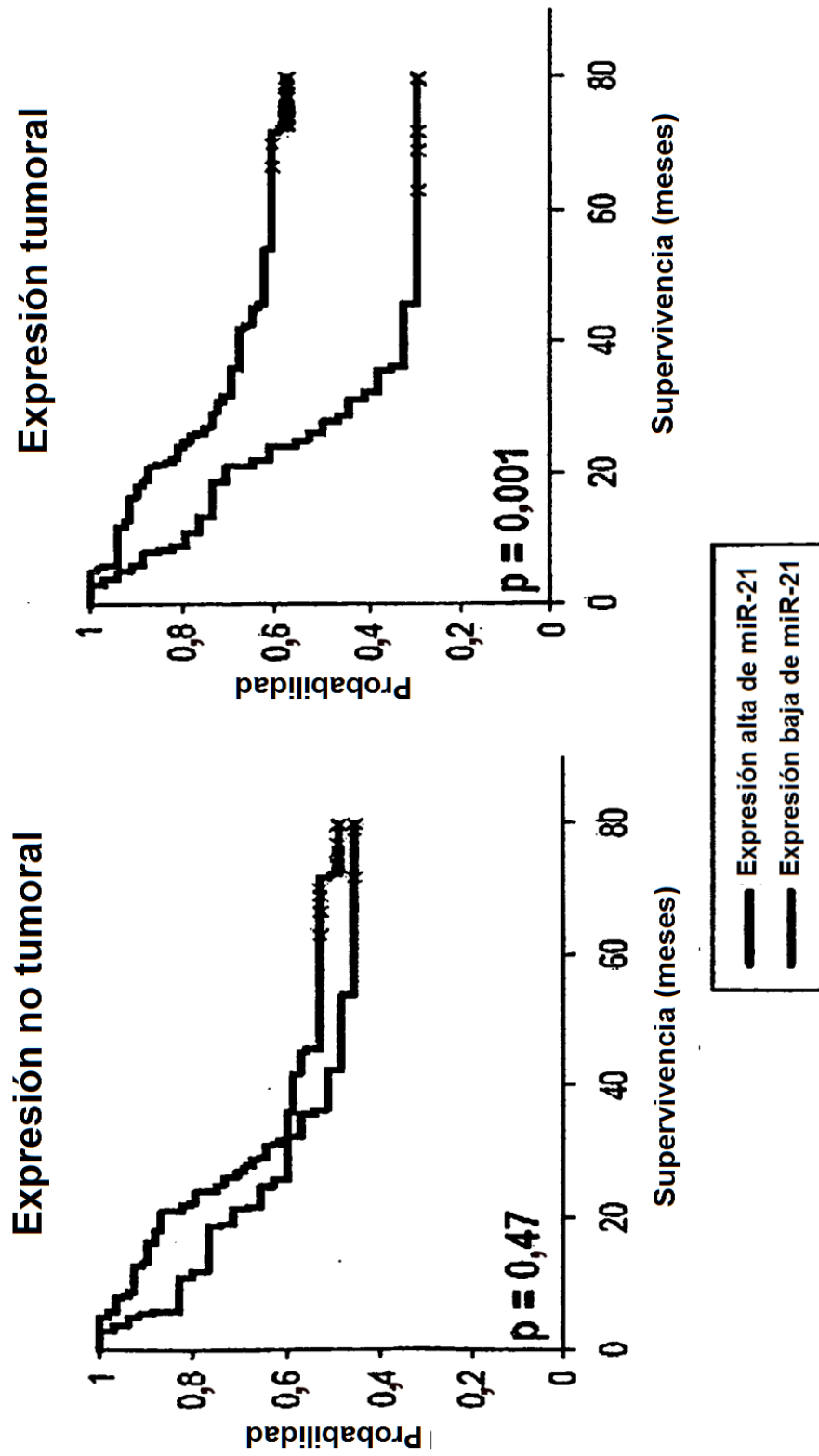


Figura 3b

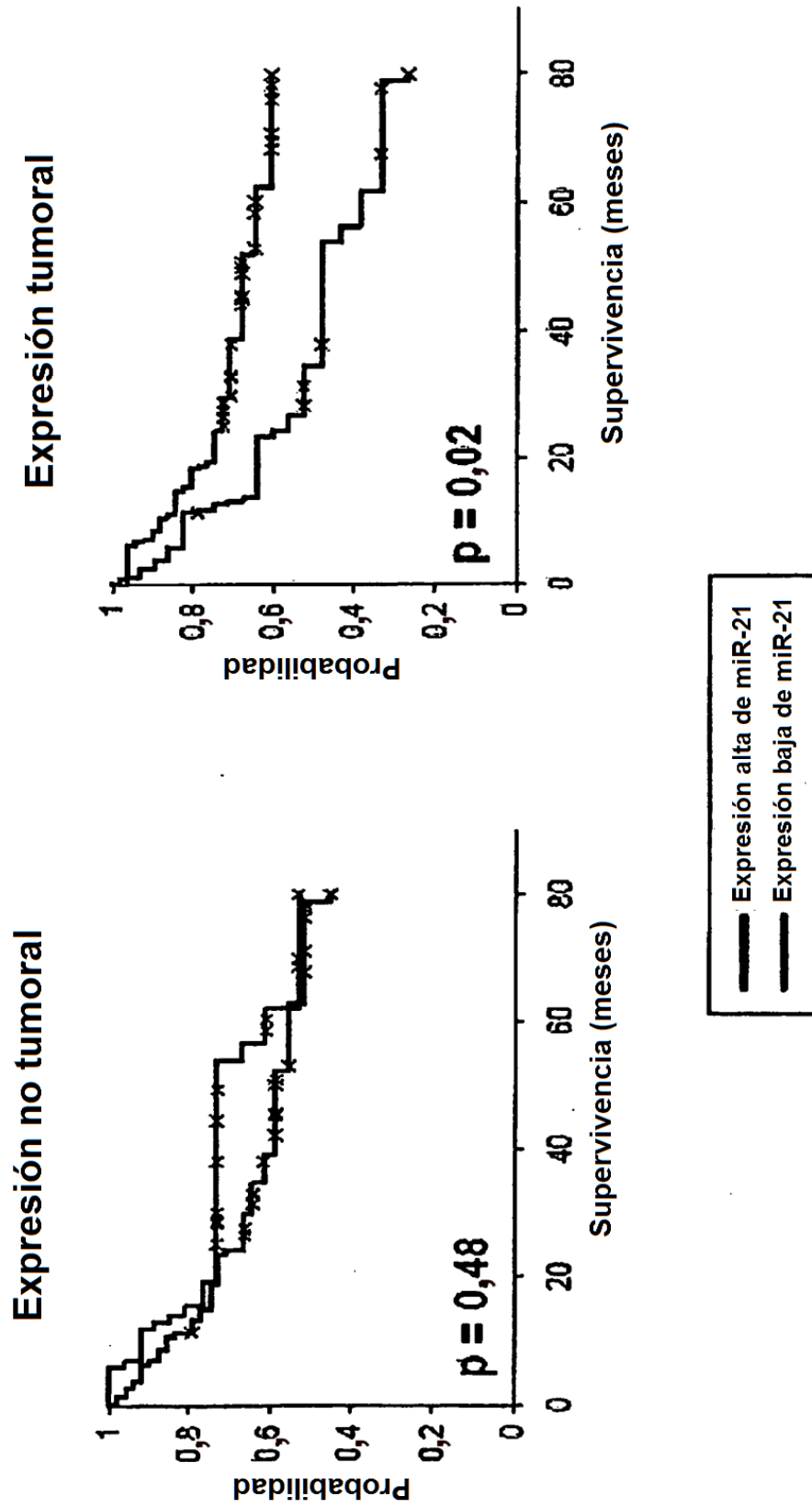


Figura 4a

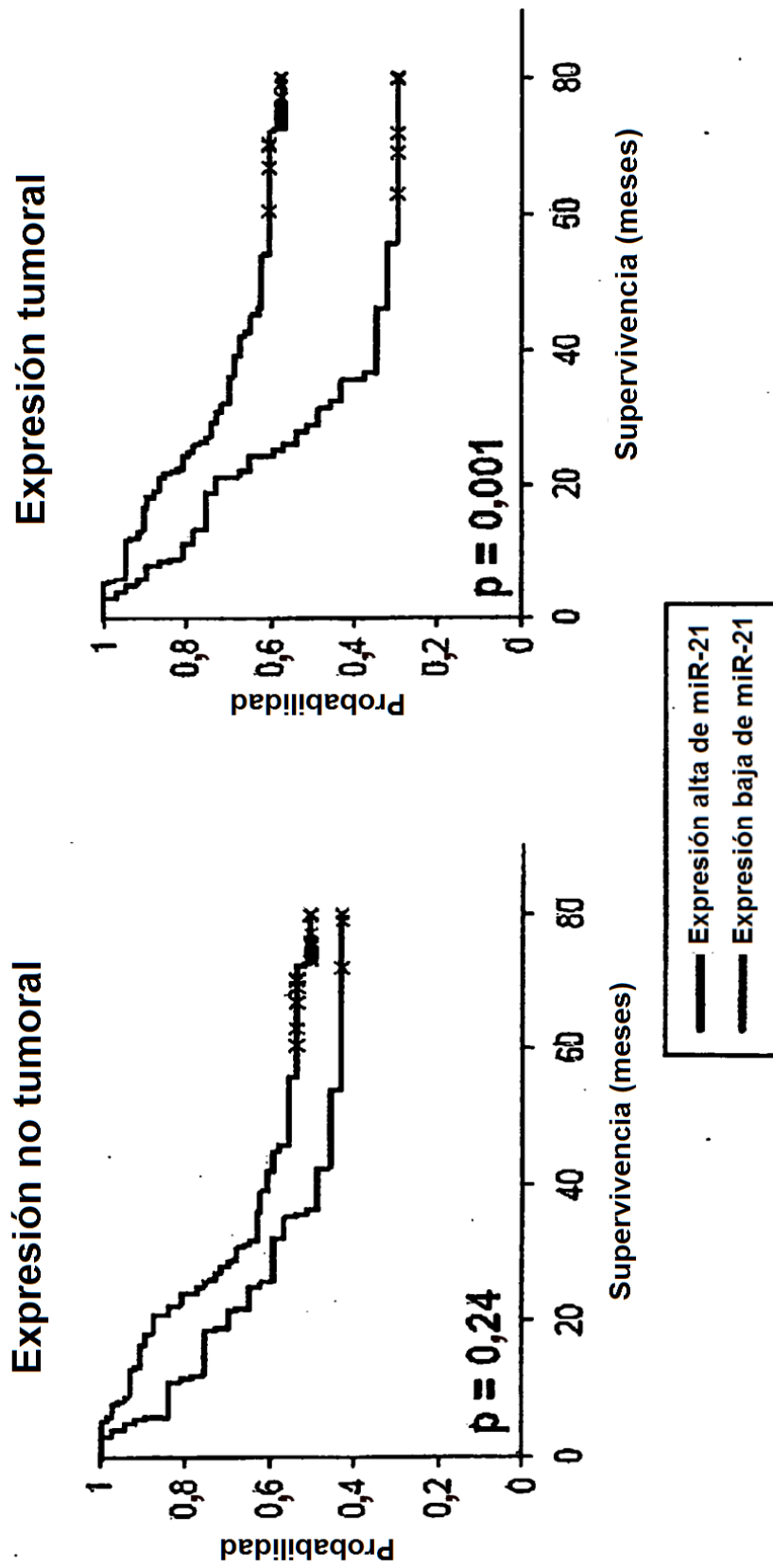


Figura 4b

Sujetos de estadio II/III

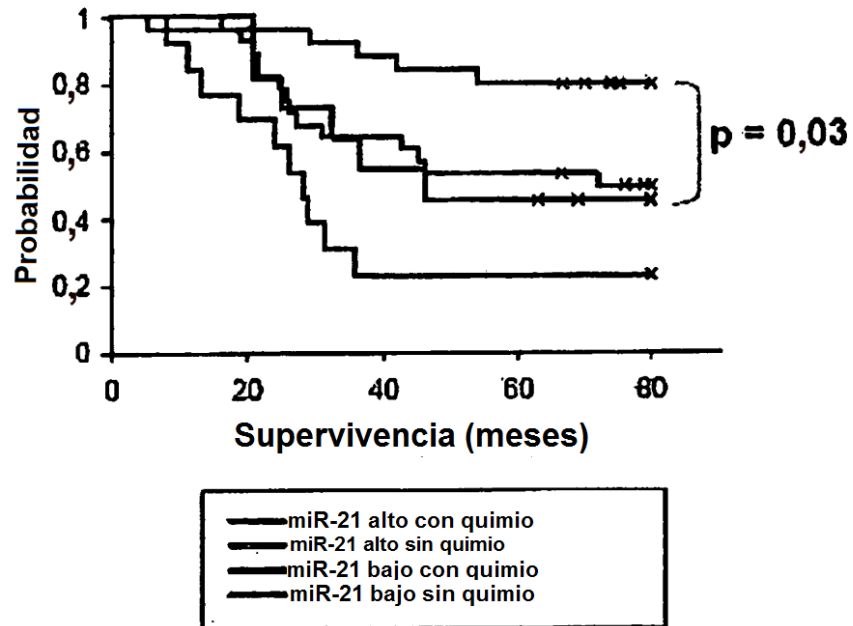


Figura 5a

Sujetos de estadio II

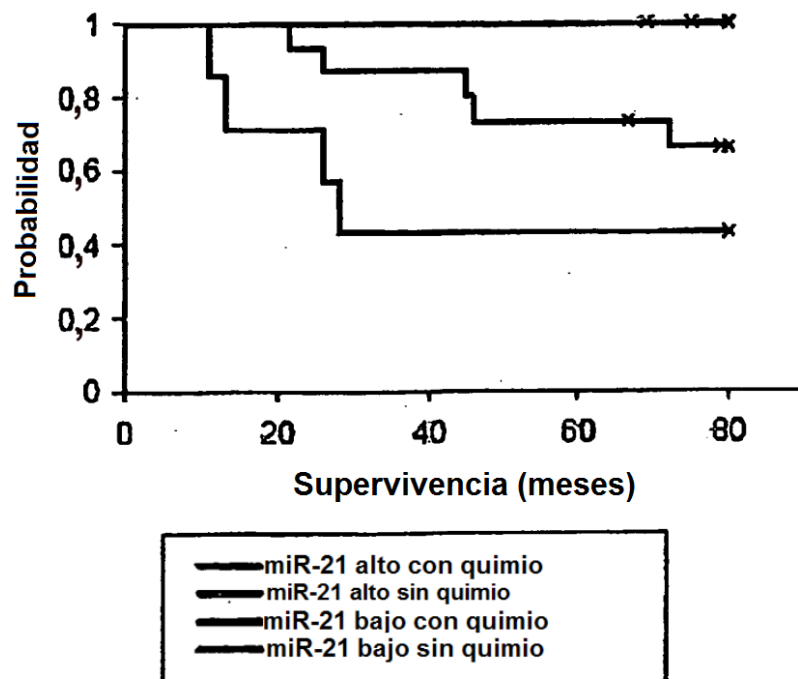


Figura 5b

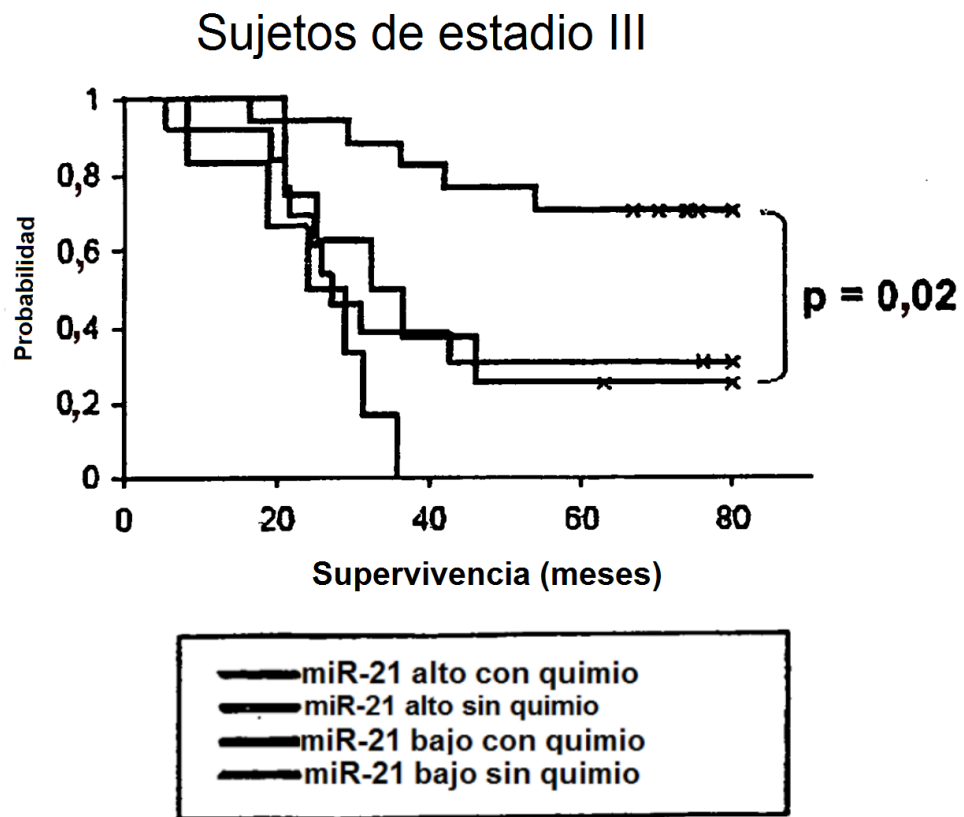


Figura 5c

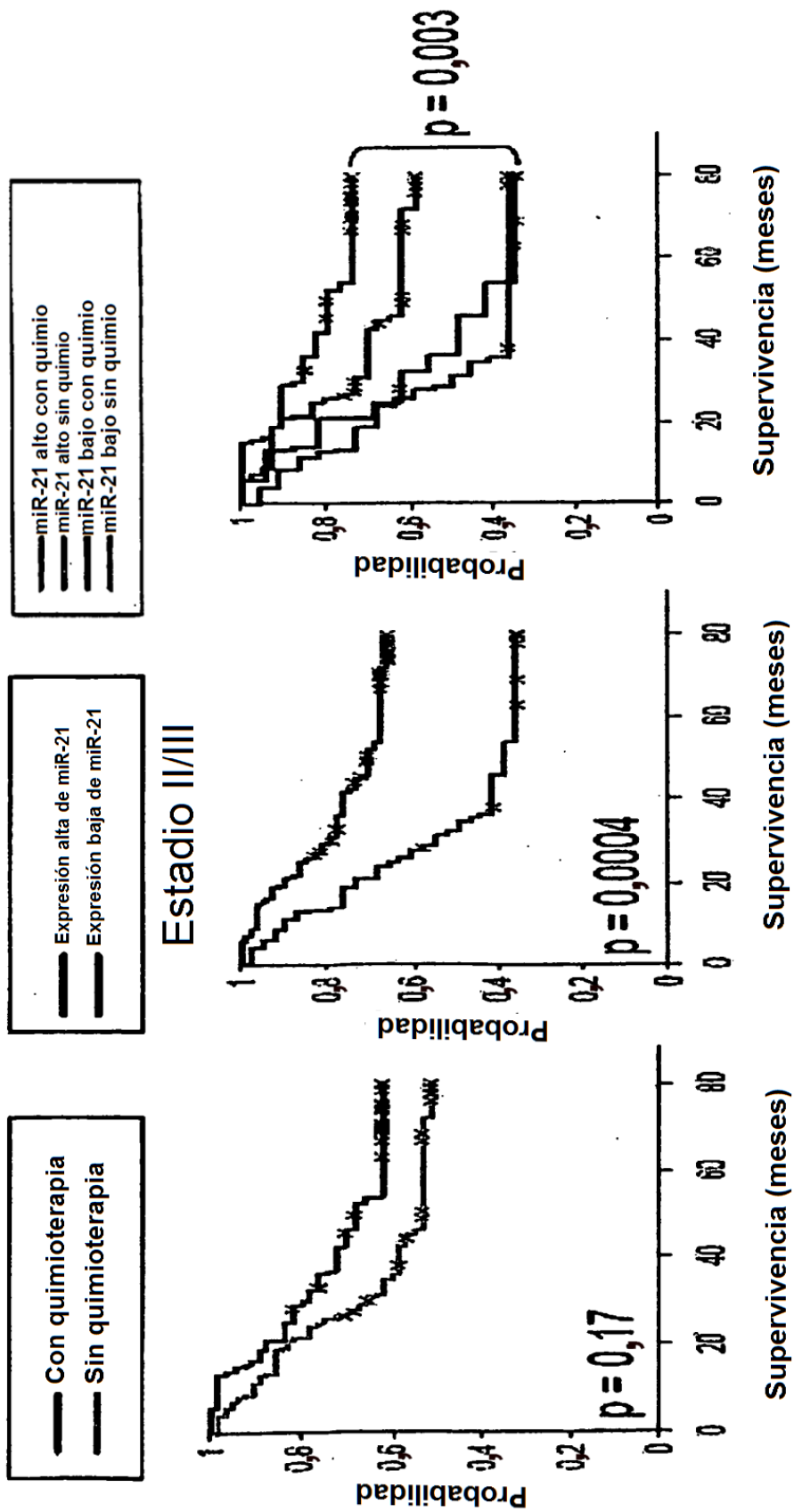


Figura 6a

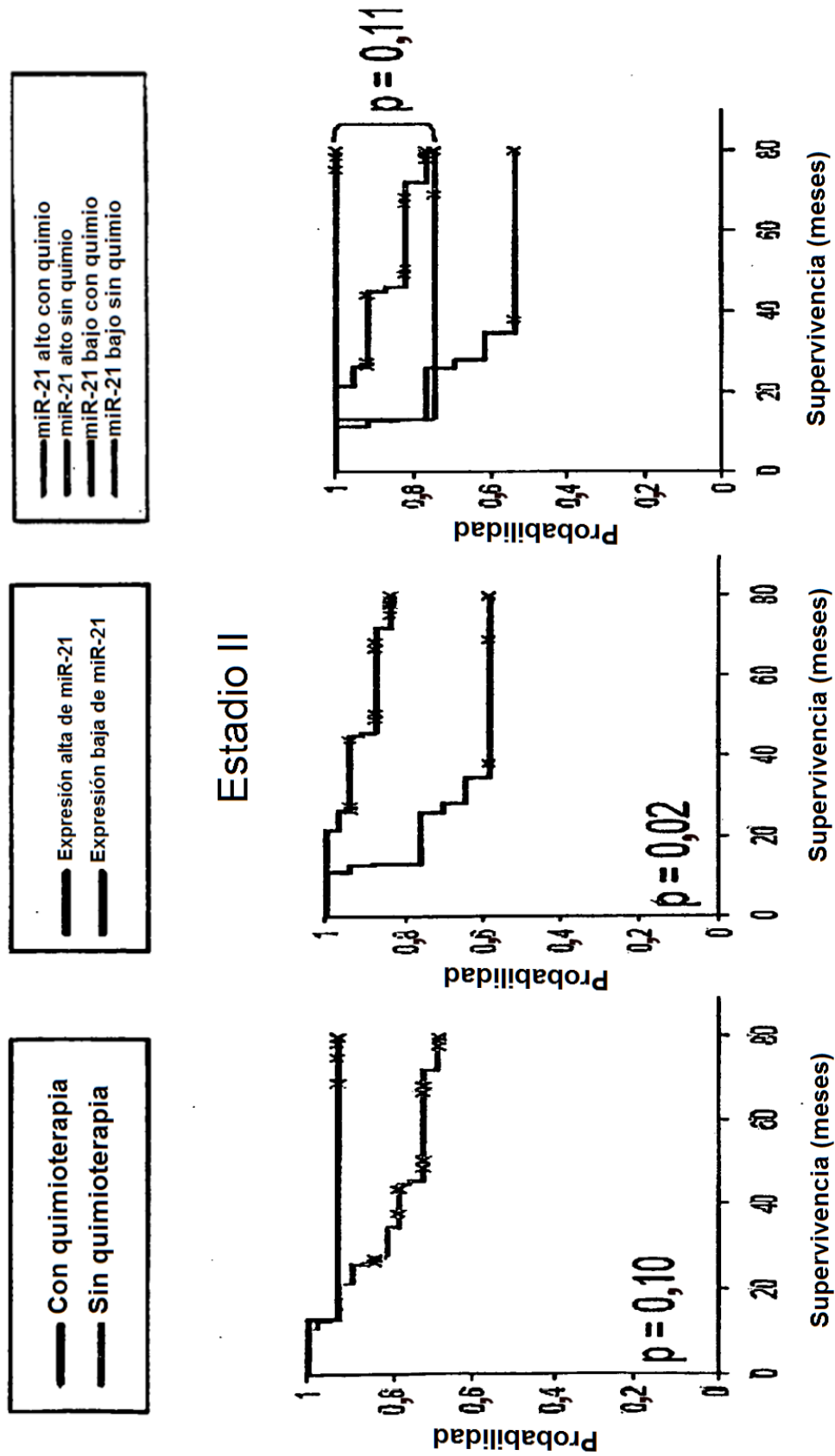


Figura 6b

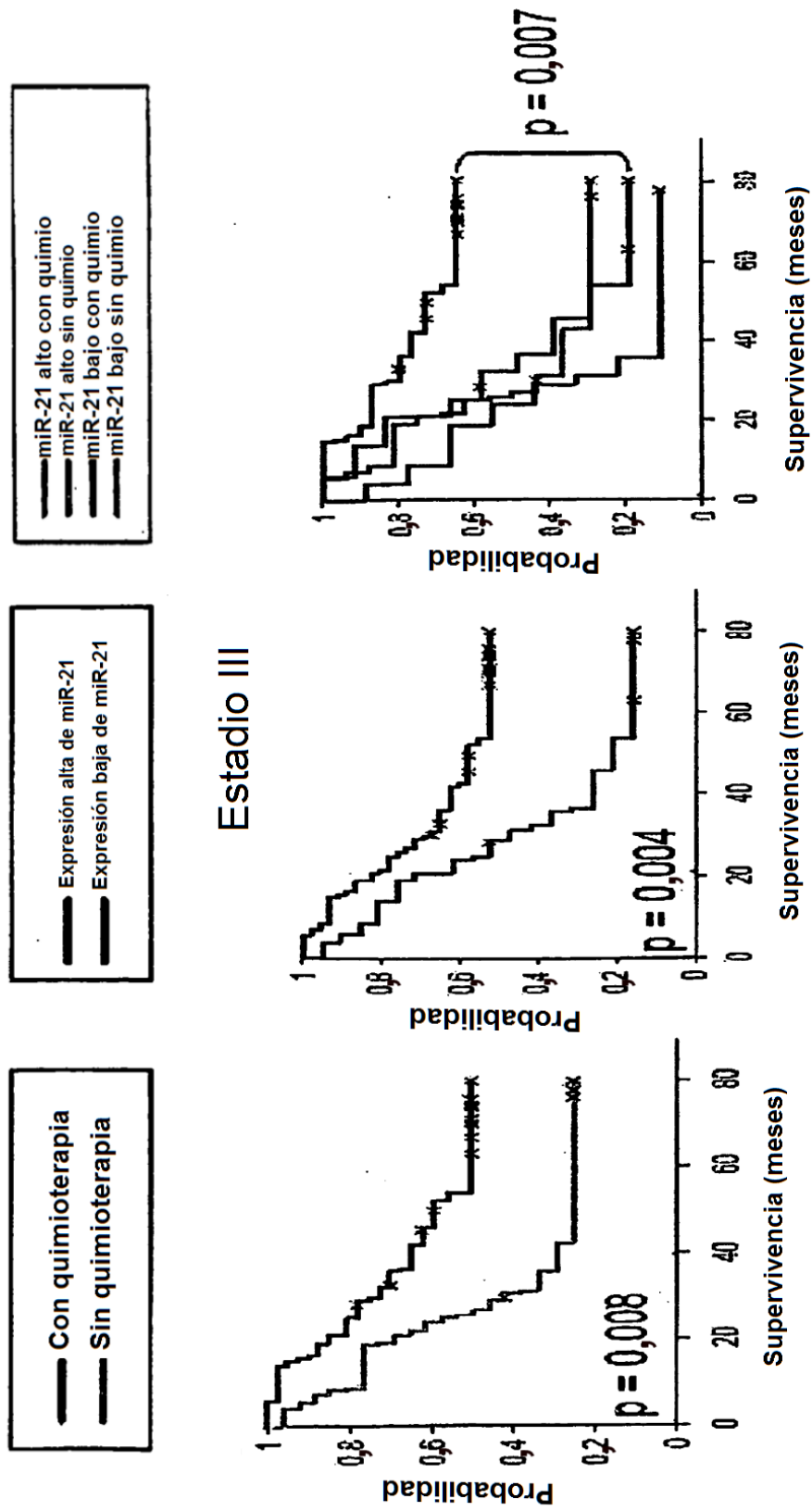


Figura 6c

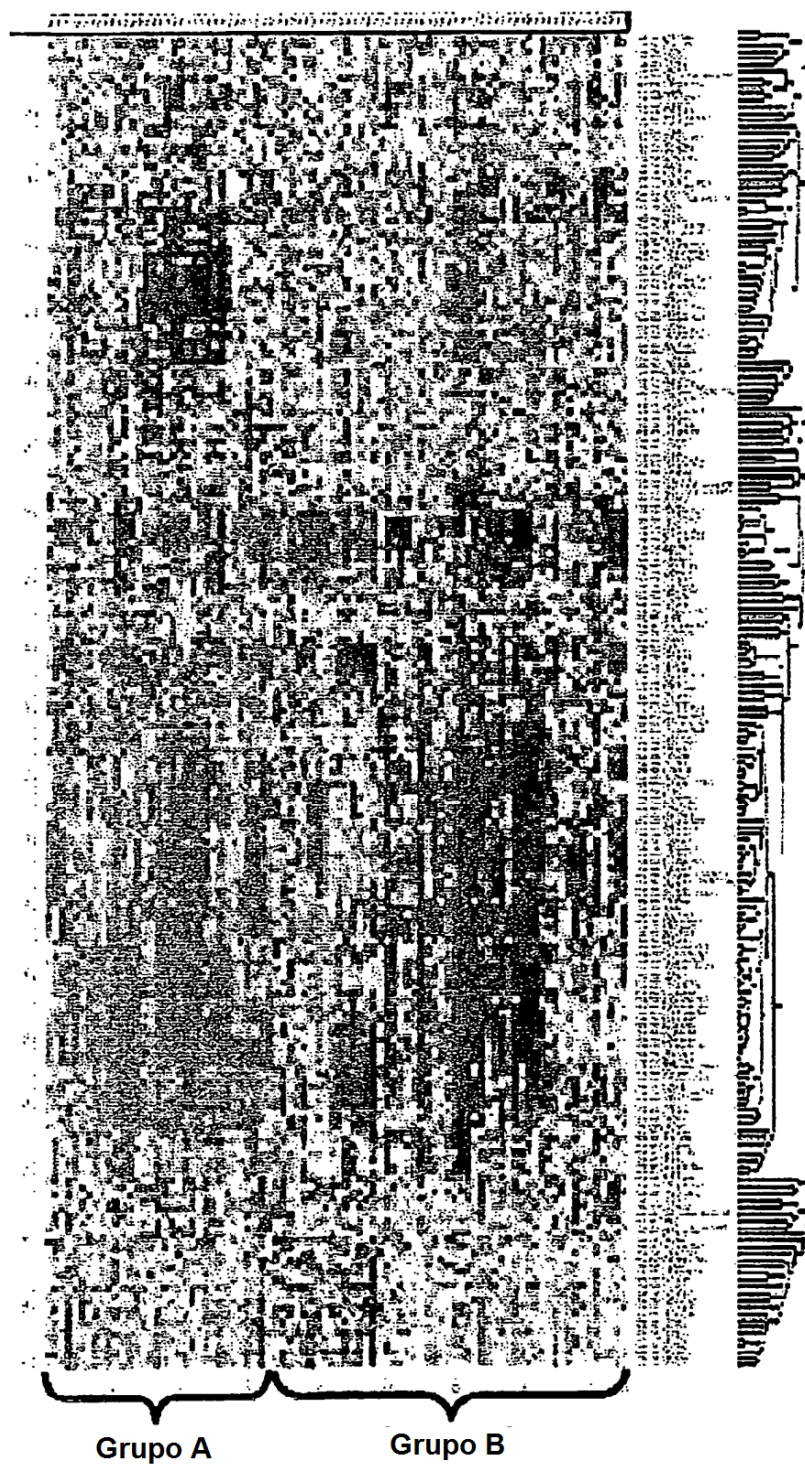


Figura 7a

	Grupo A	Grupo B	total
Estadio I	5	3	8
Estadio II	15	14	29
Estadio III	11	25	36
Estadio IV	1	9	10
total	32	51	

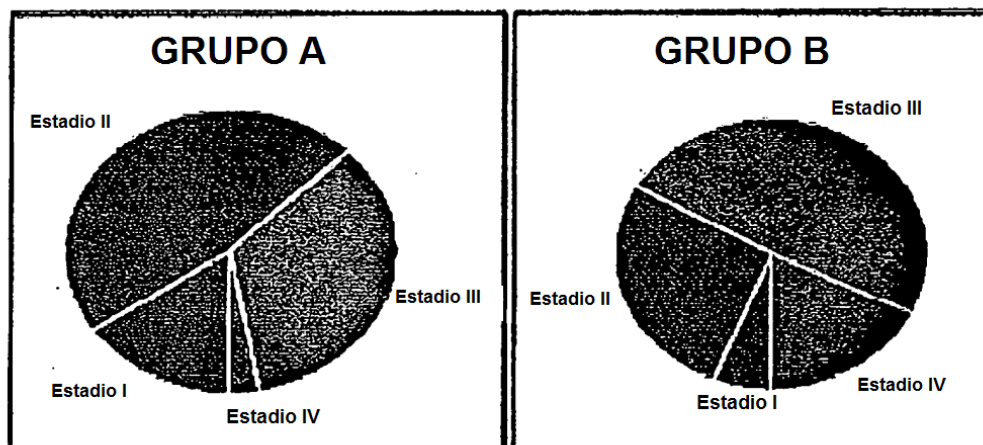


Figura 7b

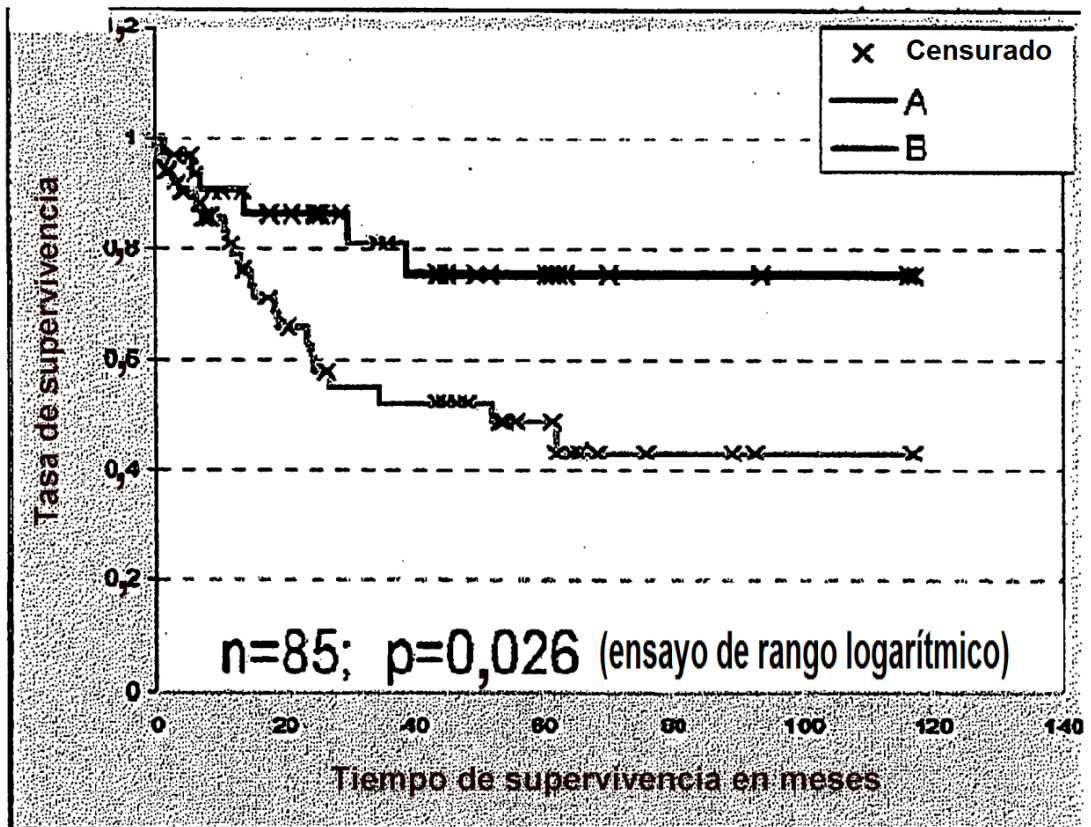
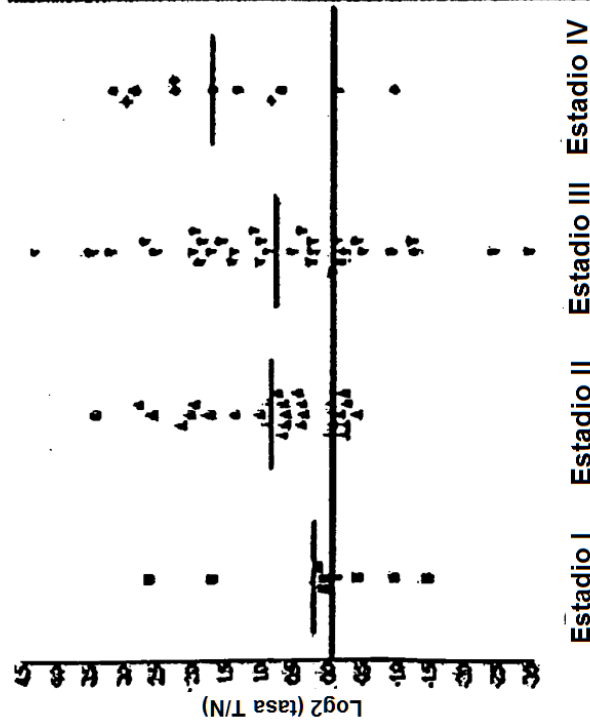
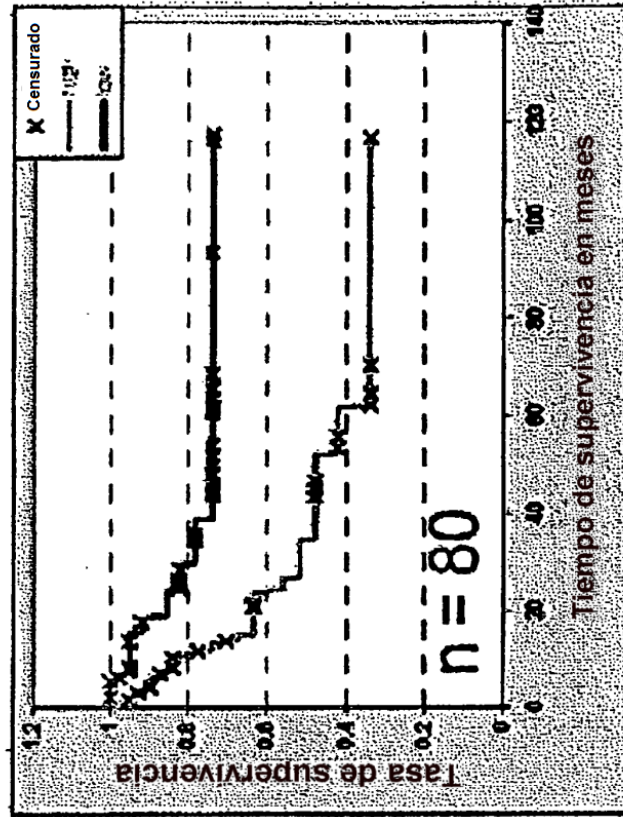


Figura 7c

hsa-miR-21



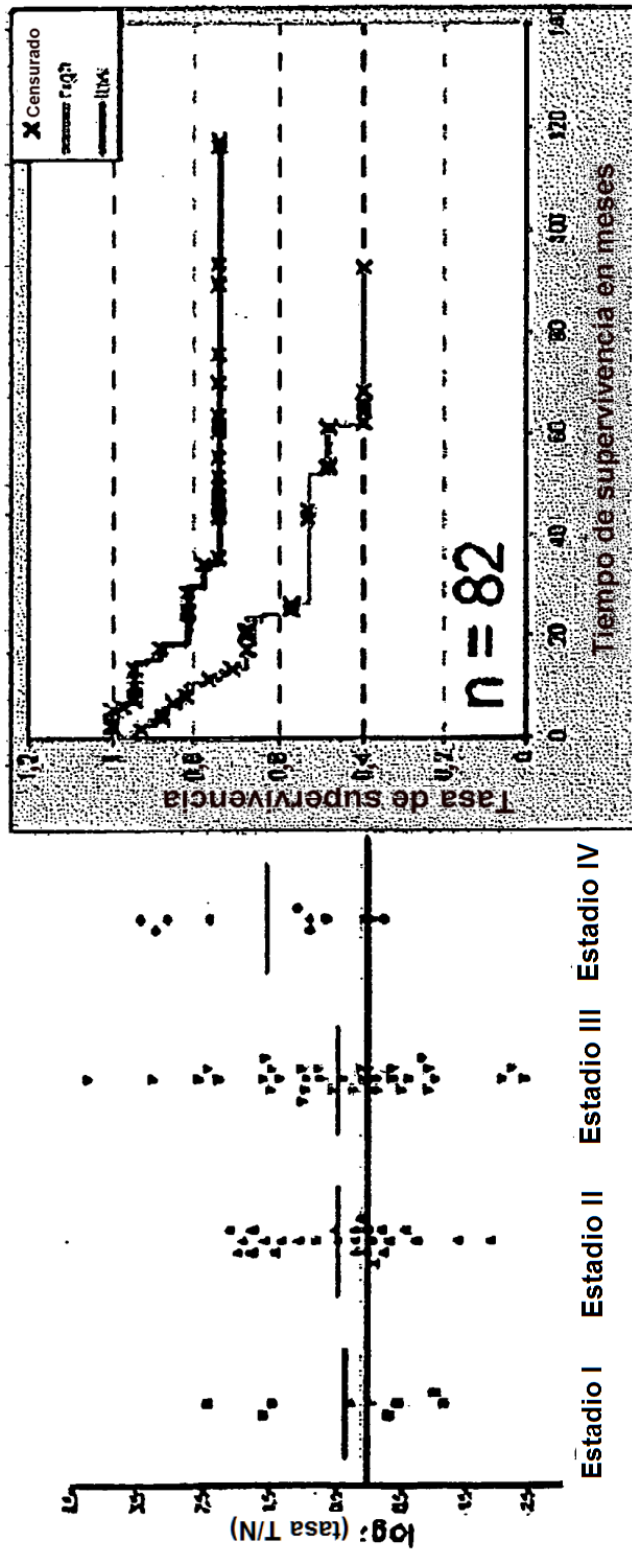
Tendencia; $p = 0,034$



$p = 0,004$ (rango logarítmico)
alto basado en la mediana

Figura 8a

hsa-miR-106a



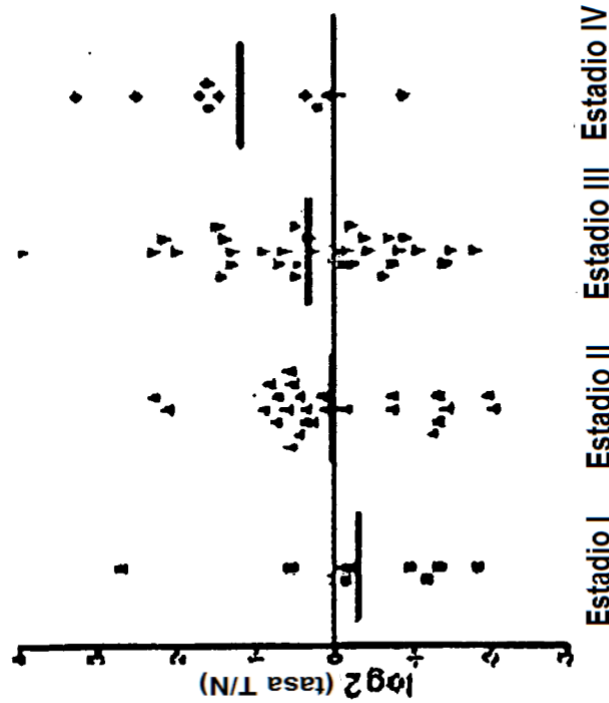
Tendencia; $p = 0,13$

$p = 0,013$ (rango logarítmico)

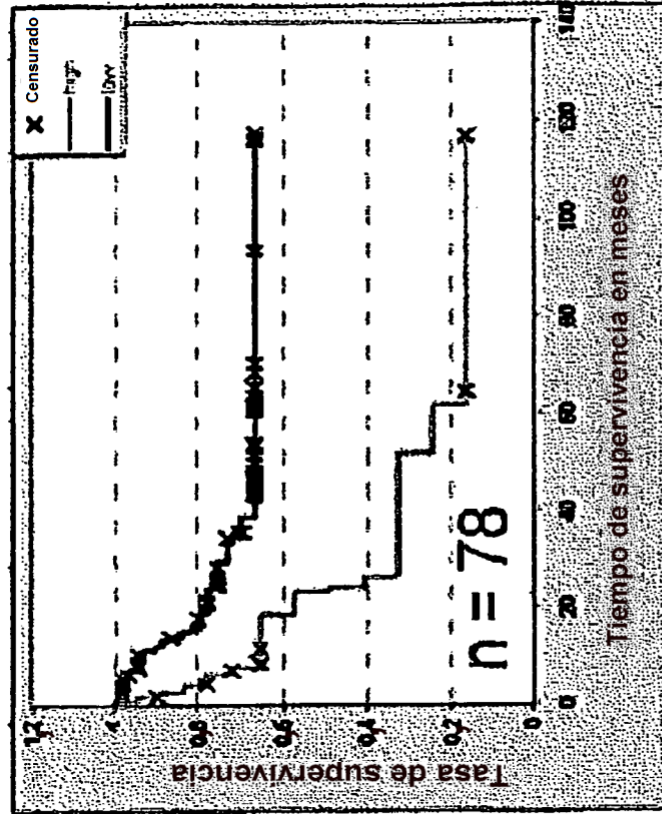
alto basado en la mediana

Figura 8b

hsa-miR-181b



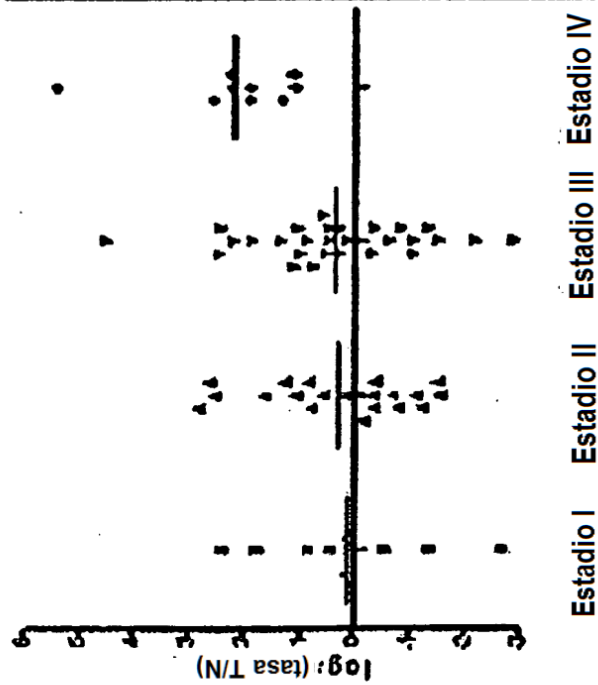
Tendencia; $p = 0,016$



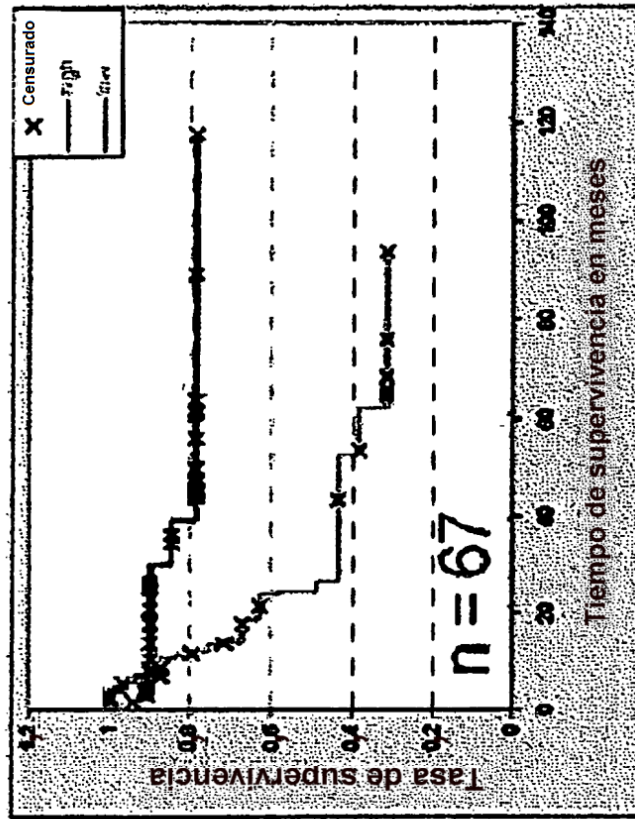
$p = 0,0003$ (rango logarítmico)
alto basado en el cuartil mayor

Figura 8c

hsa-miR-203



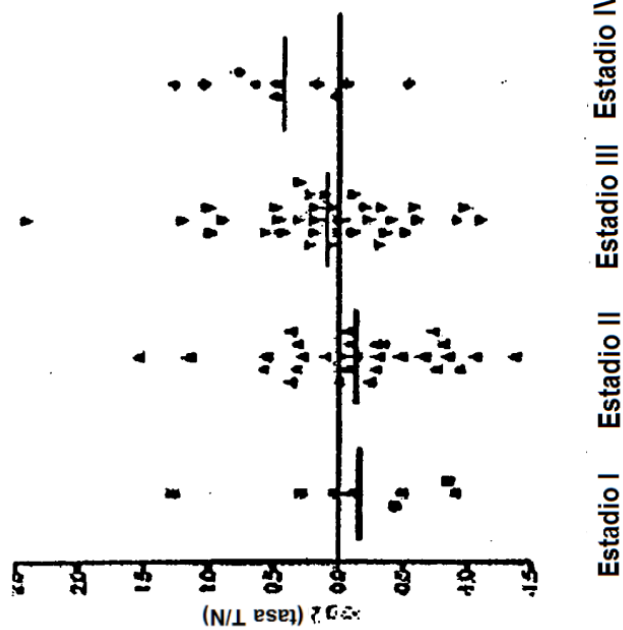
Tendencia; $p = 0,016$



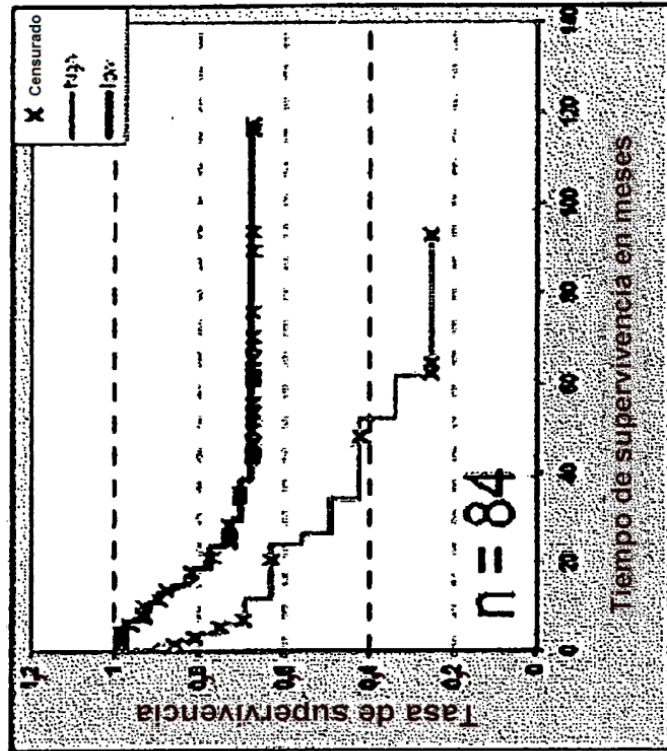
$p = 0,004$ (rango logarítmico)
alto basado en la mediana

Figura 8d

hsa-let-7g



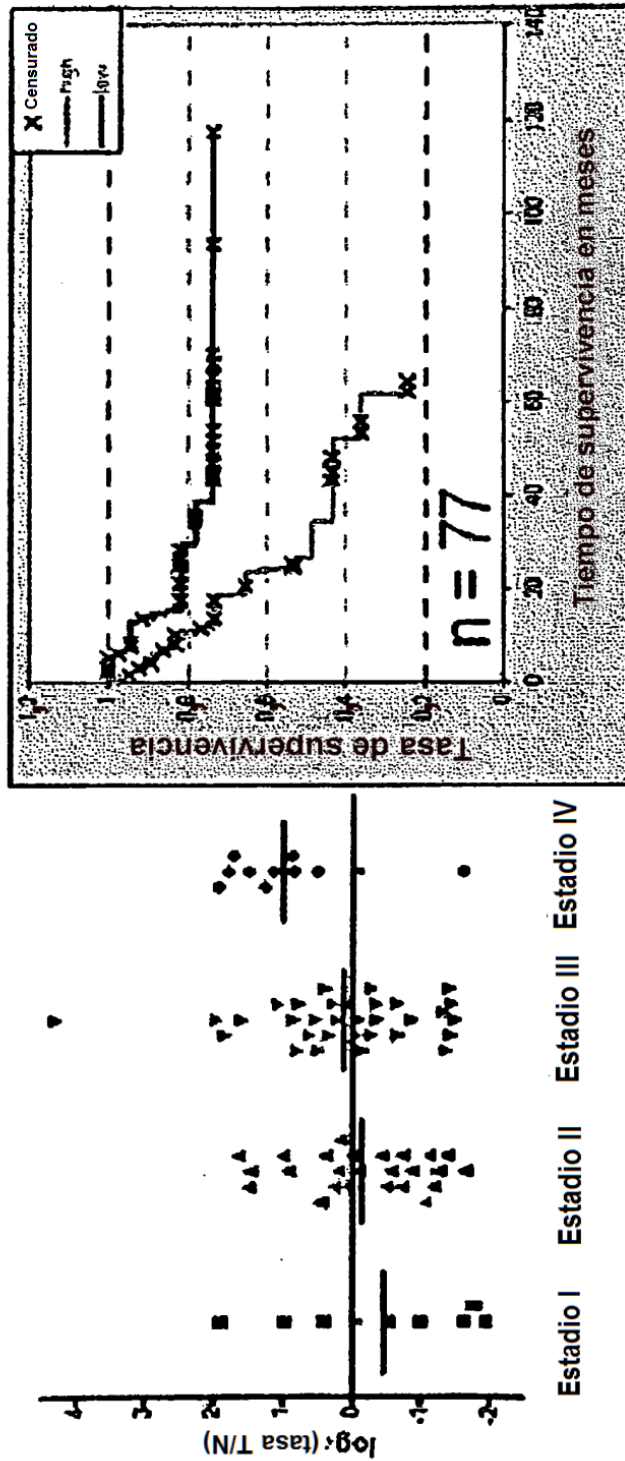
Tendencia; $p = 0,010$



$p = 0,003$ (rango logarítmico)
alto basado en el cuartil mayor

Figura 8e

hsa-miR-29a

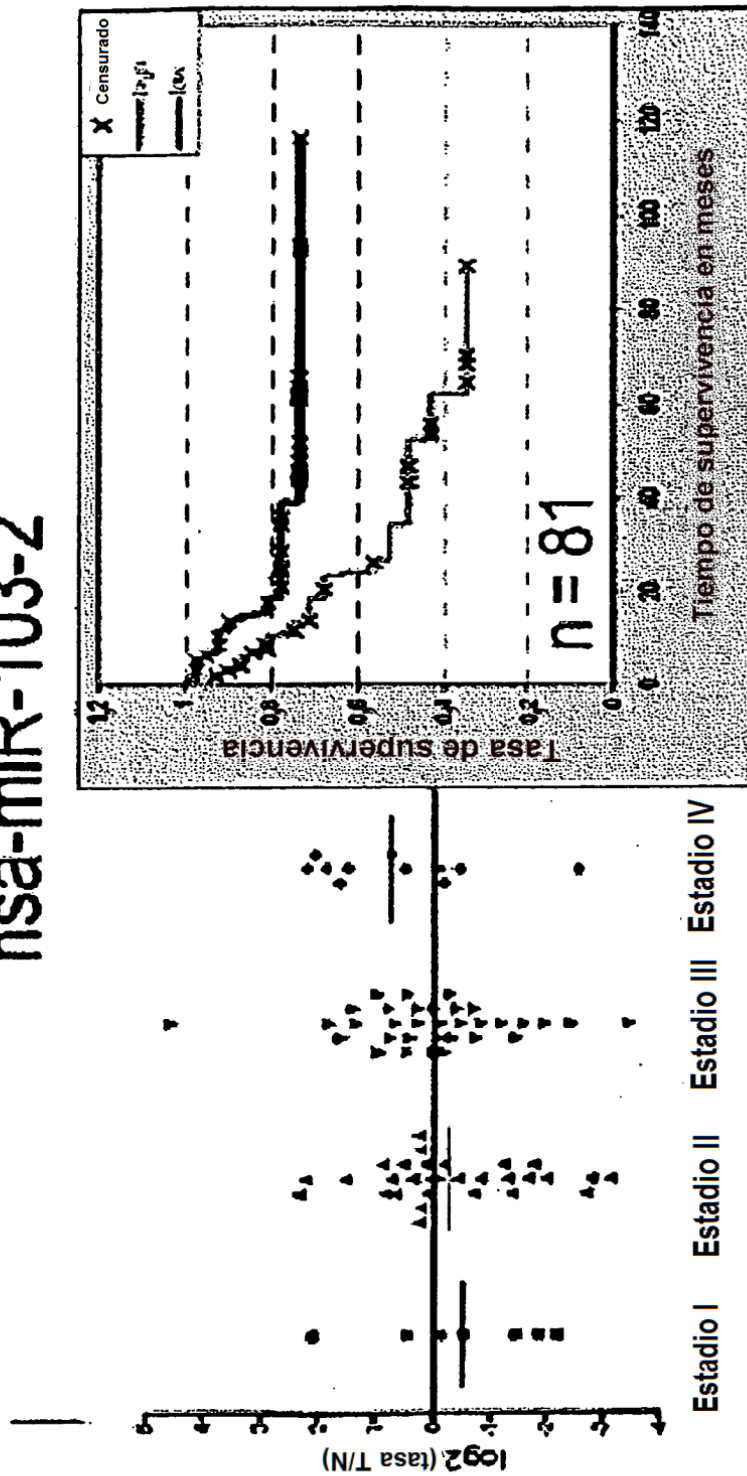


Tendencia; $p = 0,005$

$p = 0,004$ (rango logarítmico)
alto basado en la mediana

Figura 8f

hsa-miR-103-2

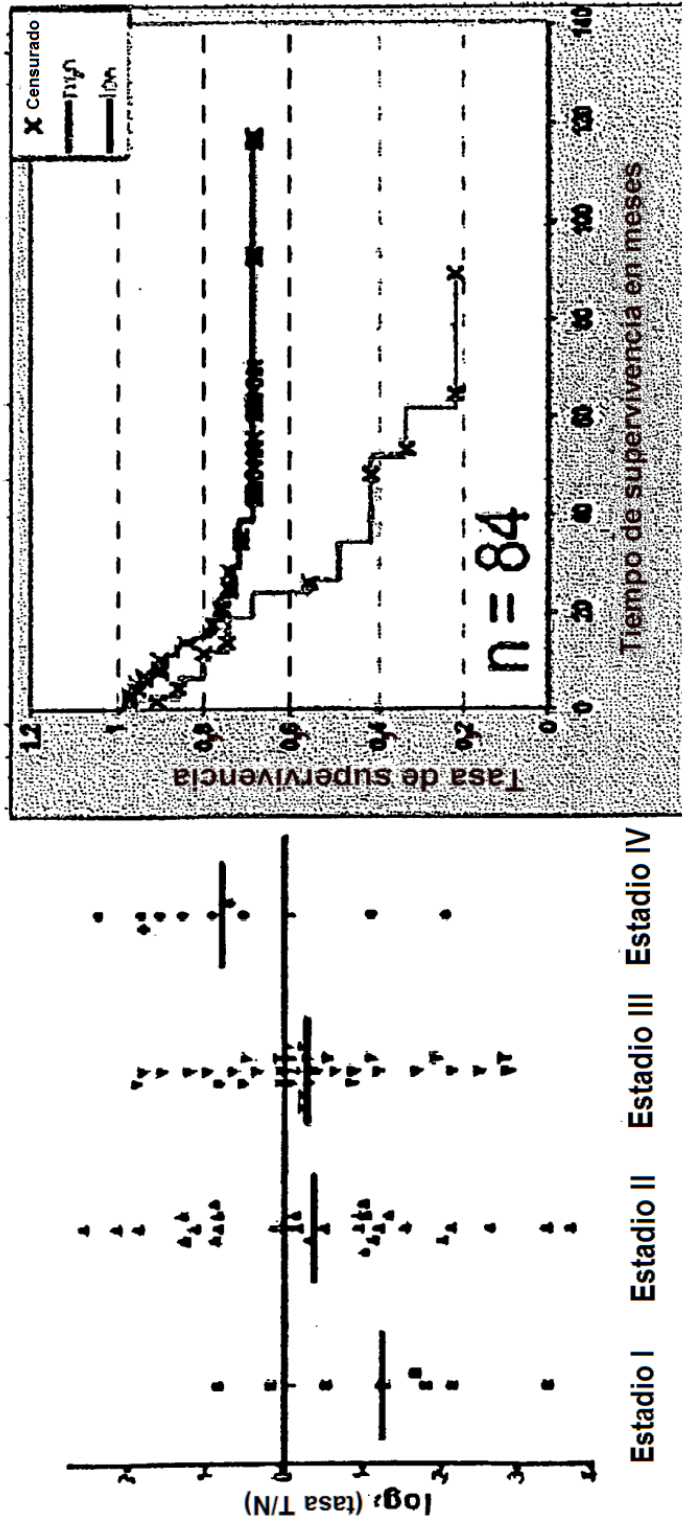


Tendencia; $p = 0,033$

$p = 0,015$ (rango logarítmico)
alto basado en la mediana

Figura 8g

hsa-miR-10a



Tendencia; $p = 0,008$

$p = 0,013$ (rango logarítmico)
alto basado en el cuartil mayor

Figura 8h

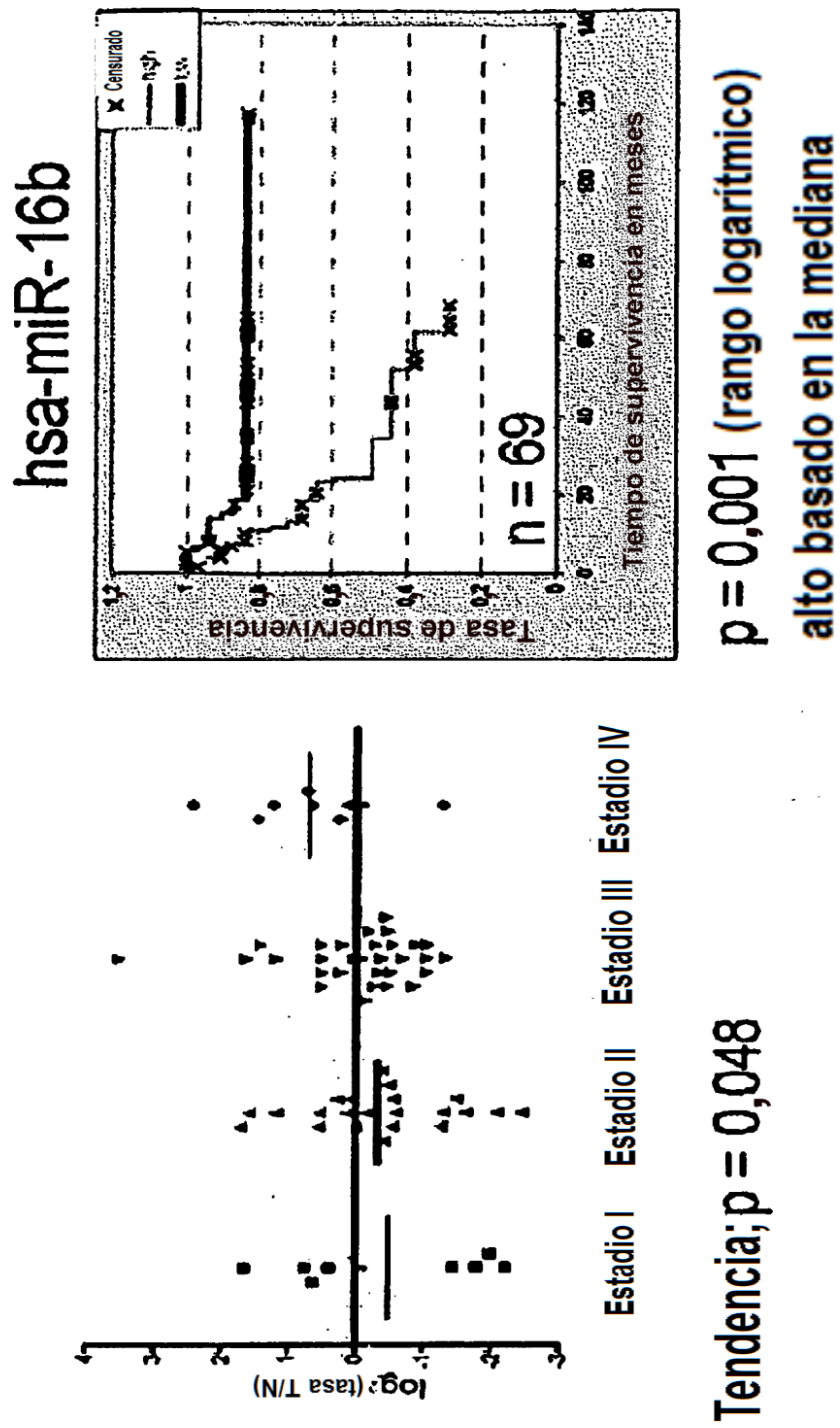


Figura 8i

Dendrograma para experimentos de agrupamiento,
usando distancia euclídea y enlace completo

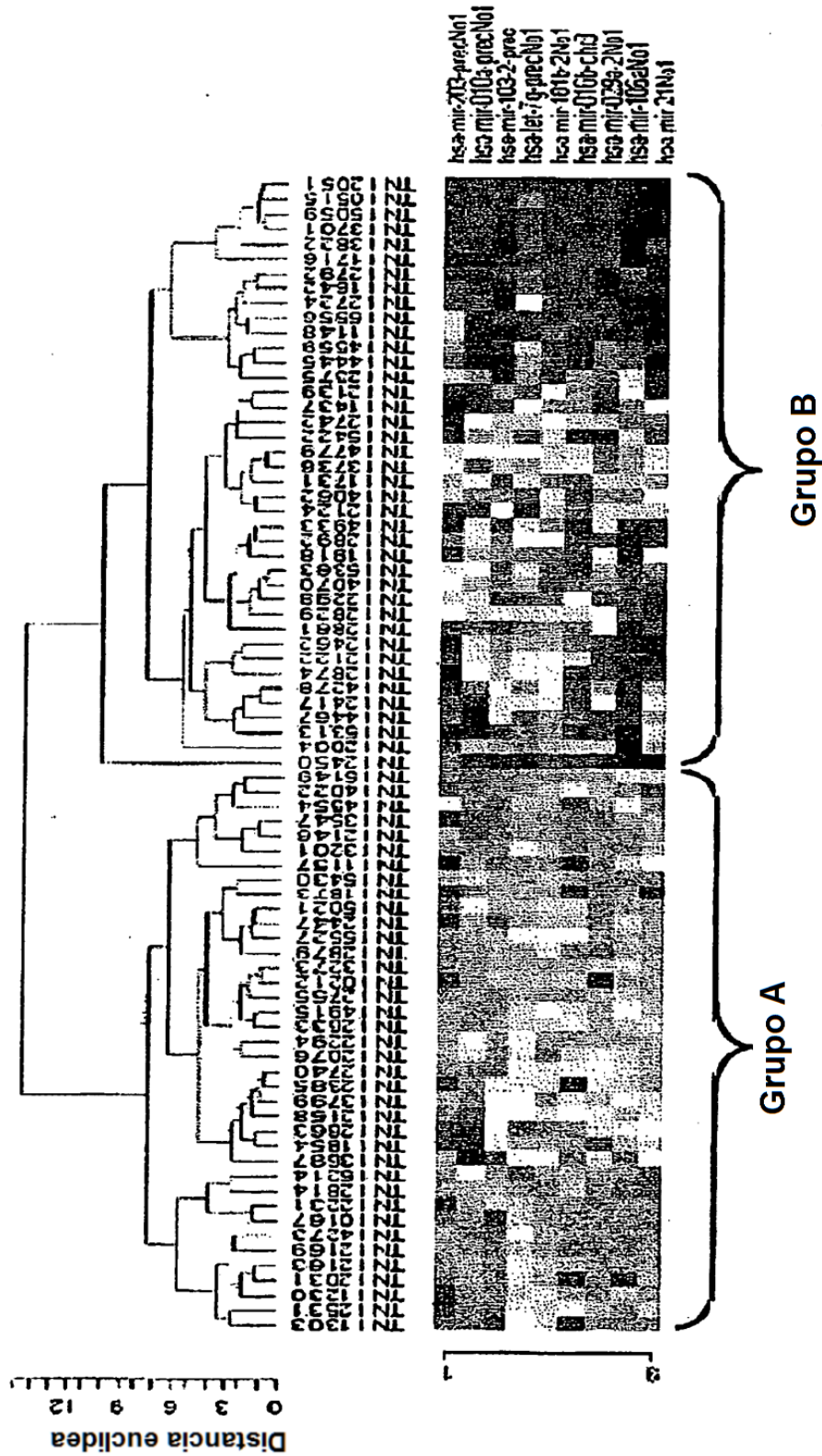


Figura 9a

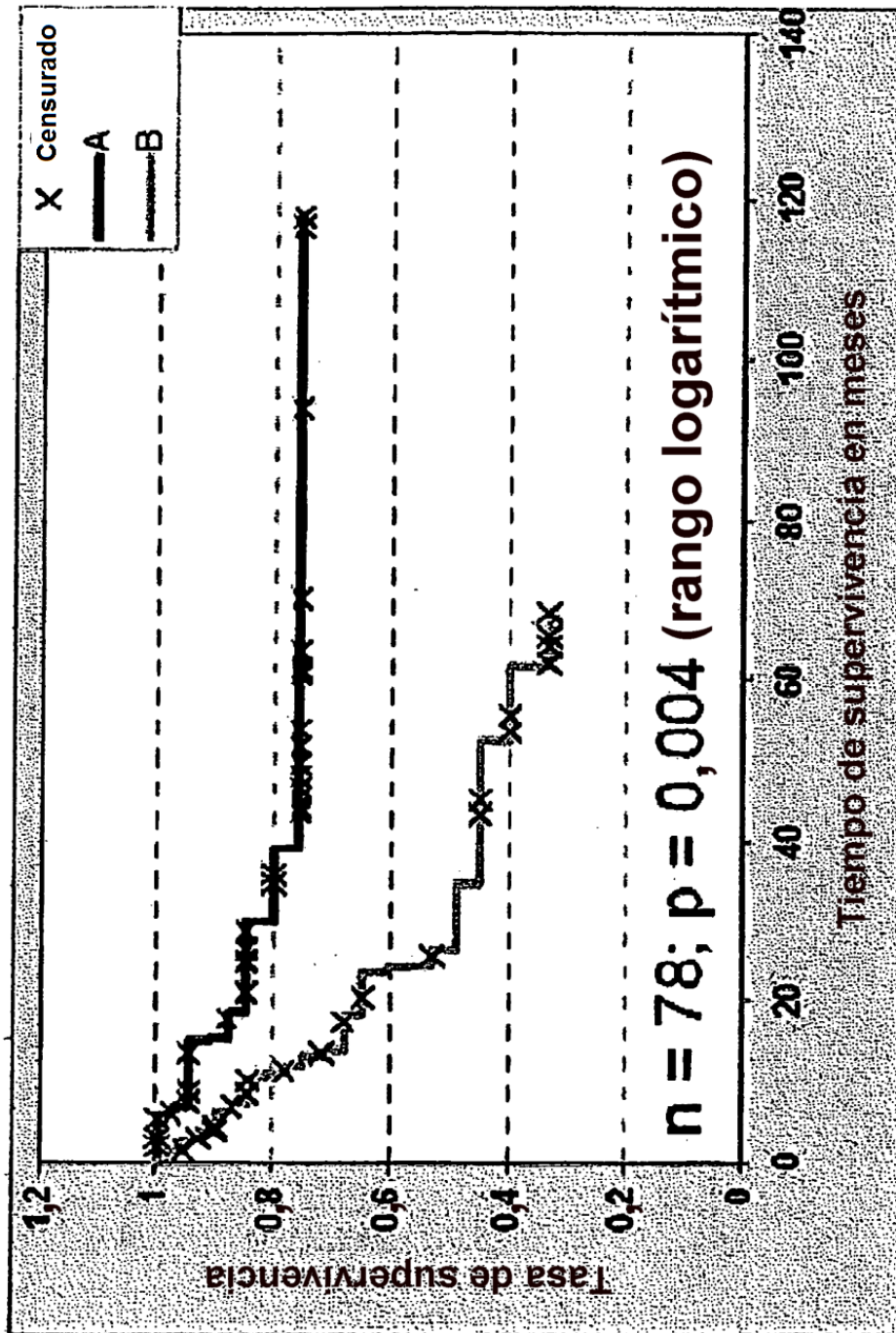


Figura 9b