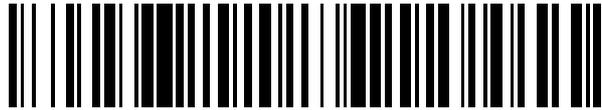


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 416**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2007 E 07867402 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2087135**

54 Título: **Firma de expresión del microARN para predecir la supervivencia y la metástasis en el carcinoma hepatocelular**

30 Prioridad:

01.11.2006 US 855895 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 U.S.A., AS REPR. BY
THE SECRETARY, DEPT. OF HEALTH & HUMAN
SERVICES, THE NAT. INST. OF HEALTH (50.0%)**

72 Inventor/es:

CROCE, CARLO M.;

WANG, XIN W.;

BUDHA, ANURADHA y

TANG, ZHAO-YOU

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 425 416 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

Firma de expresión del microARN para predecir la supervivencia y la metástasis en el carcinoma hepatocelular

Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas y estado con respecto al patrocinio de la investigación

La presente invención reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional Ser. N° 60/855.895 presentada el 1 de noviembre de 2007. Esta invención se produjo con el apoyo del gobierno bajo la concesión NCI N° RO1 Ca128609. El gobierno tiene ciertos derechos sobre esta invención.

Antecedente de la invención

El carcinoma hepatocelular (CHC) es un cáncer con un pronóstico extremadamente malo que hace que siga siendo una de las enfermedades malignas más comunes y agresivas en todo el mundo (1; 2). El sombrío resultado se ha atribuido a las señas de identidad más importantes del CHC, la metástasis intrahepática y la recurrencia postquirúrgica. Las nuevas colonias tumorales invaden frecuentemente las ramas más importantes de la vena porta y posiblemente otras partes del hígado (3-6). La resección o el trasplante hepático, son las mejores opciones para una potencial curación, sin embargo, solo aproximadamente el 20 por ciento de los pacientes con CHC son actualmente candidatos elegibles para una intervención quirúrgica, los cuales se definen por parámetros de función hepática relativamente normales y lesión tumoral manejable según determinan los sistemas clínicos de estadificación disponibles. Además, los pacientes sometidos a resección a menudo tienen una alta frecuencia de metástasis/recurrencia, y la supervivencia a los 5 años de la operación es solo del 30-40 por ciento.

El trasplante de hígado en pacientes con CHC, es controvertido debido a la escasez de donantes de órganos y al mal cumplimiento de los sistemas actuales de estadificación al seleccionar los candidatos apropiados, especialmente en los primeros estadios de la enfermedad. La evaluación clínica y las decisiones terapéuticas en el CHC son complejas porque dependen del grado de diseminación cancerosa (estadio del tumor) y de la función hepática residual (estado de enfermedad crónica hepática). Aunque los sistemas de estadificación de los tumores en general están bien definidos y aceptados, el CHC es una excepción, en el que se han introducido a nivel global muchos sistemas de estadificación diferentes para adaptar cada estrato de la enfermedad y en el que hay actualmente una falta de consenso en cuanto a cuál es el mejor (7-12). Por tanto, sigue siendo una tarea desafiante el establecer un factor de predicción preciso del pronóstico y un criterio de selección sensible que se pueda aplicar a los pacientes con CHC para tomar decisiones racionales de tratamiento.

La identificación recientemente de biomarcadores moleculares de pronóstico ofrece una esperanza para el diagnóstico precoz del CHC, utilizando una tecnología de micromatriz de ADNc, los investigadores desarrollaron una firma de expresión de un gen única para predecir el pronóstico y la metástasis en pacientes con CHC (13). Varios estudios recientes (14; 15), confirmaron la presencia de una firma molecular de pronóstico en especímenes clínicos de CHC primario. Como normalmente el CHC se presenta con un hígado inflamado, los inventores también han desarrollado un factor de predicción único que se basa en la expresión de genes en el microentorno hepático de pacientes con CHC, que es sustancialmente diferente que el del tumor (16). Como en muchas otras firmas de pronóstico que se basan en el perfil de expresión génica del ADNc, tanto las firmas del tumor como las del microentorno contienen varios cientos de genes celulares codificantes. Por tanto, identificar los biomarcadores relevantes o las dianas farmacológicas potenciales y cuestionar las puntuaciones de los genes en la práctica clínica, sería una ardua tarea.

Los estudios recientes indican que realizar un perfil de expresión con los productos génicos de un pequeño ARN no codificante (-22nt) conocido como microARN (miARN o miR) es un procedimiento superior a otros en la clasificación y el pronóstico de los subtipos de cáncer (17-19). Los miARN existen en muchos organismos y tienen funciones reguladoras en la traducción y degradación del ARNm por emparejamiento de bases en sitios parcialmente complementarios del ARNm, predominantemente en la región 3' no traducida (20-22). Los miARN se expresan de precursores de ARN largos que son procesados por Drosha, una nucleasa celular, y posteriormente son transportados al citoplasma por un mecanismo dependiente de la exportina-5 (23; 24). Los miARN entonces son escindidos por la encima DICER, y dan como resultado miARN 17-24 nt que se asocian con un complejo silenciador inducido por ARN (25; 26). Los patrones de expresión, función y regulación de los miARN en las células humanas normales y neoplásicas son desconocidos en su mayoría, pero los datos que van surgiendo y su localización frecuente en sitios frágiles, puntos de ruptura habituales o regiones de amplificación o pérdida de heterocigosidad revelan que pueden tener funciones importantes en la carcinogénesis humana.

El aumento de la expresión del precursor de miR-155 en linfomas de Burkitt y la delección frecuente o la regulación negativa de varios miARN se ha observado en leucemia linfocítica crónica de células B (LLC) y en muchos tipos de cáncer, incluyendo el de mama, pulmón, ovárico, cervical, colorrectal, próstata, y linfóide (17;18; 27-34). Los análisis funcionales también han revelado la regulación negativa de PTEN por el miR-21, la función supresora tumoral de la familia let-7 y la función oncogénica de grupo 7-92 de miRI (35-37). Se ha demostrado la relevancia clínica y biológica de los patrones de expresión de miARN en la LLC de células B humana y en tumores sólidos, incluyendo los tumores de mama (18; 30; 38). Cada miARN tiene la capacidad potencial para regular la expresión de cientos de genes codificantes y por tanto para modular varias rutas celulares, que incluyen la proliferación, apoptosis y

respuesta al estrés (39). Este fenómeno hace que los miARN sean marcadores moleculares superiores y dianas para el cuestionamiento, y como tal, el perfil de expresión del miARN se puede utilizar como una herramienta diagnóstica del cáncer (17; 40).

Sumario de la invención

5 En general, en el presente documento se proporciona una firma del miARN única que puede distinguir significativamente la metástasis venosa en el CHC del CHC libre de metástasis. Al contrario que en los sistemas de estadificación del CHC, esta firma es capaz de predecir la supervivencia y la recurrencia en los pacientes de CHC con tumores multinodulares o solitarios, incluyendo aquellos que se encuentran en los primeros estadios de la enfermedad. Además, esta firma es un factor de predicción independiente y significativo del pronóstico del paciente y de la recaída cuando se compara con otros parámetros clínicos disponibles. Esta firma del miARN es útil para hacer posible el pronóstico del CHC y tiene una utilidad clínica para la identificación precoz de los pacientes con CHC que son propensos a metástasis/recurrencia.

15 Se desvela en el presente documento un sistema de identificación de un carcinoma hepatocelular crónico (CHC), firmas de miARN específicas de cáncer que se expresan de manera diferente con respecto a las células normales de control.

En consecuencia, lo que se desvela en el presente documento son procedimientos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar CHC, que comprende la medición de al menos un producto génico del miR en una muestra de ensayo del sujeto, en el que la alteración en el nivel del producto génico del miR en la muestra de ensayo, indica si el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar CHC.

20 Según un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para predecir la supervivencia de un sujeto con carcinoma hepatocelular (CHC) que comprende la medición del nivel de un producto génico del miR en una muestra de ensayo del tumor celular de un sujeto, en el que una alteración en el nivel del producto génico del miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico del miR en una muestra control de tejido libre de metástasis, es indicativo de la supervivencia del sujeto, en el que el producto génico del miR comprende; miR 30c [SEC. ID N°: 6], miR-124a [SEC. ID N°: 4], miR-207 [SEC. ID N°: 18] y miR- 219 [SEC. ID N°: 20], y donde dicha alteración comprende un aumento de la expresión de los niveles de miR-219 [SEC. ID N°: 20] y miR-207 [SEC. ID N°: 18] y una disminución de los niveles de miR-30c [SEC. ID N°: 6] y miR-124a [SEC. ID N°: 4].

25 Según otro aspecto de la invención se proporciona un kit para generar un perfil del miARN de una muestra, que consiste en, un medio de envase adecuado, a). sondas de miARN que tienen las secuencias codificadoras de miARN para: miR-30c, miR-124a, miR-207, y miR-219; o b). sondas de miARN que tienen las secuencias codificadoras de miARN para: miR-30c , miR-124a , miR- 207 , miR-219 , miR-338, miR-185, miR-1-2, miR-19a, miR-34a, miR-9-2, miR-122a, miR-148a, miR-125b-2, miR-15a, miR-30e, miR-148b, miR-194, miR-30a, miR-126, y miR-let-7g.

35 El nivel de al menos un producto génico del miR se puede medir utilizando una variedad de técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica. En una realización, el nivel de este al menos un producto génico de miR se mide utilizando un análisis de transferencia de Northern. En otra realización, el nivel de al menos un producto génico de miR es menor que el nivel correspondiente del producto génico del miR en la muestra de control. También, en otra realización, el nivel de al menos un producto génico del miR en una muestra de ensayo puede ser mayor que el nivel del correspondiente producto génico del miR de la muestra de control.

40 Se desvelan también en el presente documento procedimientos diagnósticos de un CHC asociado con uno más marcadores en un sujeto, que comprenden la medición del nivel de al menos un producto génico del miR en una muestra de un sujeto con CHC, en el que una alteración del nivel de al menos un producto génico del miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel del correspondiente producto génico del miR en una muestra control, es indicativa de que el sujeto tiene CHC asociado con uno o más marcadores de pronóstico.

45 En una realización, el nivel de al menos un producto génico del miR se mide por transcripción inversa de ARN en una muestra de ensayo obtenida del sujeto, para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana; hibridando los oligodesoxinucleótidos en una micromatriz que comprende sondas de oligonucleótidos específicos de ARN para proporcionar un perfil de hibridación con la muestra de ensayo; y, comparando el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con el perfil de hibridación de una muestra control. Una alteración en la señal de al menos un miARN es indicativa de que el sujeto, tiene o está en riesgo de desarrollar CHC.

Se desvelan también en el presente documento procedimientos para tratar el CHC en un sujeto, en el que la señal de al menos un miARN, con respecto a la señal generada por la muestra de control, está desregulada (por ejemplo, regulada negativa o positivamente).

55 En ciertas realizaciones, una micromatriz comprende los oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más miARN seleccionados de una o más de las SEC. ID N°s 1-22, como se muestra en la Figura 11, y, en ciertas realizaciones en particular, un producto génico del miR comprende una o más de: miR-219 [SEC ID N°: 20], miR-207 [SEC ID N°: 18], miR-30c [SEC ID N°: 6], y miR124A [SEC ID N°: 4].

Se desvelan también en el presente documento procedimientos para diagnosticar si un sujeto tiene o está en riesgo

de desarrollar un CHC, asociado con uno o más de los marcadores de pronóstico adverso en un sujeto, por transcripción inversa de ARN de una muestra de ensayo obtenida de un sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana; hibridando los oligodesoxinucleótidos diana en una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos para miARN; y, comparando el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con el perfil de hibridación generado a partir de una muestra control. Una alteración en la señal es indicativa de que el sujeto o tiene o está en riesgo de desarrollar el cáncer.

También se desvelan en el presente documento procedimientos para tratar el CHC en un sujeto que tiene CHC en el que al menos un producto génico del miR está regulado negativamente o regulado positivamente en las células cancerígenas del sujeto con respecto a las células del control. Cuando uno o más productos génicos del miR están regulados negativamente en las células cancerígenas, el procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos uno de los productos génicos aislados del miR, tal que la proliferación de las células cancerígenas en el paciente se inhiba. Cuando uno o más de los productos génicos del miR están regulados positivamente en las células cancerígenas, el procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto génico del miR, de forma que la proliferación de las células cancerígenas en el sujeto se inhiba. En ciertas realizaciones, al menos un producto génico aislado del miR se selecciona de miR-219 [SEC ID N°: 20], miR-207 [SEC ID N°: 18], miR-30c [SEC ID N°: 6] y miR124A y combinaciones de los mismos.

También se desvelan en el presente documento procedimientos para el tratamiento del CHC de un sujeto, que comprenden: determinar la cantidad de al menos un producto génico del miR en las células con CHC, con respecto a las células del control; y, alterar la cantidad de producto génico del miR expresado en las células CHC: administrando al sujeto una cantidad eficaz de al menos un producto génico aislado del miR, si la cantidad de producto génico del miR que expresan las células cancerígenas es menor que la cantidad del producto génico del miR expresado por las células del control; o administrando al sujeto una cantidad eficaz de al menos un producto para la inhibición de la expresión de al menos un producto génico del miR, si la cantidad del producto génico del miR expresado en las células cancerígenas es mayor que la cantidad de producto génico del miR expresado por las células del control, de forma que la proliferación de las células cancerígenas en el sujeto se inhiba. En ciertas realizaciones, al menos un producto génico aislado del miR se selecciona del grupo que consiste en miR-219 [SEC ID N°: 20], miR-207 [SEC ID N°: 18], miR-30c [SEC ID N°: 6] y miR124A y combinaciones de los mismos.

También se desvelan en el presente documento composiciones farmacéuticas para tratar el CHC, que comprenden al menos un producto génico aislado del miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico aislado del miR que corresponden a un producto génico del miR que está regulado negativamente en las células del CHC con respecto a las células del control adecuadas.

En otra realización particular, la composición farmacéutica comprende al menos un compuesto regulador de la expresión de miR (por ejemplo, un inhibidor) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se desvelan también en el presente documento composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un compuesto regulador de la expresión de miR que es específico para un producto génico del miR que está regulado positiva o negativamente en las células del CHC con respecto a las células del control adecuadas.

Se desvelan también en el presente documento procedimientos para identificar un agente anti CHC, que comprenden proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico del miR asociado con la disminución de los niveles de expresión en las células del CHC, de forma que un incremento en el nivel del producto génico del miR en la célula, con respecto a una célula control adecuada es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti-CHC. En ciertas realizaciones, el producto génico del miR comprende uno o más de las SEC. ID N°s 1-22, como se muestra en la Figura 11. En ciertas realizaciones particulares, un producto génico del miR comprende uno o más de: miR-219 [SEC ID N°: 20], miR-207 [SEC ID N°: 18], miR-30c [SEC ID N°: 6] y miR124A [SEC ID N°: 4].

También se desvelan en el presente documento procedimientos para identificar un agente anti CHC, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico del miR asociado con el aumento de los niveles de expresión en las células del CHC, en el que un descenso en el nivel del producto génico del miR en la célula, con respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti CHC.

En ciertas realizaciones, el producto génico del miR comprende una o más de las SEC. ID N°s 1-22, como se muestra en la Figura 11. En ciertas realizaciones en particular, un producto génico del miR comprende uno o más de: miR-219 [SEC ID N°: 20], miR-207 [SEC ID N°: 18], miR-30c [SEC ID N°: 6], y miR124A [SEC ID N°: 4].

Varios objetivos y ventajas de esta invención serán evidentes para los expertos en la técnica con la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas, cuando se lean teniendo en cuenta los dibujos adjuntos.

Breve descripción de las figuras

El documento de patente o solicitud contiene al menos un dibujo en color. Las copias de esta patente o publicación de la solicitud de patente con dibujos en color se proporcionarán por la Oficina, tras la petición y el pago de las tasas necesarias.

5 **FIGURA 1:** Esquema de la búsqueda de un indicador de un miARN que puede predecir el pronóstico del CHC.

FIGURA 2: miARN diferencialmente significativos expresados en las células metastásicas de los tejidos hepáticos en pacientes con CHC frente a las células no metastásicas.

(FIG. 2A) Grupo jerárquico de 20 genes miARN cuya expresión estaba alterada significativamente ($p < 0,001$) en muestras con metástasis (M; barras azules; $n=30$) y muestras no metastásicas (NM; barras amarillas; $n=104$) a partir de los análisis de predicción de clases utilizando 4 algoritmos diferentes (predictor de covariante compuesta, análisis discriminativo lineal, vecino más próximo y máquinas de vectores de soporte) utilizando una validación cruzada dejando uno fuera. Cada fila representa un gen individual y cada columna representa una muestra de tejido individual. Los genes se ordenaron por correlación central y unión completa de acuerdo con las relaciones de abundancia en cada muestra de tejido al compararse con una agrupación de tejido normal hepático ($n=8$), que se normalizó a la abundancia media de genes. Los seudocolores indican niveles de transcripción por debajo, iguales o por encima de la media (verde, negro y rojo, respectivamente). La escala representa las relaciones de expresión génica de -4 a 4 en una escala logarítmica de 2.

(FIG. 2B) Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de muestras de metástasis y no metástasis basándose en los resultados de predicción de 20 miARN.

20 **FIGURA 3:** Análisis de la capacidad de clasificación de la firma de 20 miARN o 4 miARN en el ensayo de la cohorte de primer estadio de CHC. El análisis de supervivencia total de Kaplan-Meier de 110 pacientes con CHC basado en la clasificación que predijo el factor de predicción de 20 miARN (FIG. 3A), o el factor de predicción de 4 miARN (FIG. 3B). El análisis de supervivencia total de Kaplan-Meier de 89 pacientes con CHC en el primer estadio de CHC basado en la clasificación que predijo el factor de predicción de 20 miARN (FIG. 3C) o el factor de predicción de 4 miARN (FIG. 3D). Análisis de supervivencia libre de recaídas de Kaplan-Meier de 89 pacientes con CHC en primer estadio de CHC basado en la clasificación que predijo el factor de predicción de 20 miARN (FIG. 3E) o el factor de predicción de 4 miARN (FIG. 3F).

FIGURA 4. Tabla 1 - muestra las características clínicas de los pacientes del Ejemplo I.

30 **FIGURA 5.** Tabla 2 - muestra los análisis univariantes y multivariantes de los factores asociados con la supervivencia y las recurrencias (TMM estadio I y II).

FIGURA 6. Tabla 3 – Sumario de 20 microARN con un valor pronóstico para predecir la supervivencia de CHC.

FIGURA 7. Tabla 4 – Estadio clínico del grupo no bien definido.

FIGURA 8. Tabla 5 – Análisis univariante y multivariante de los factores asociados con la supervivencia y la recurrencia (Estadio BCLC 0 y A).

35 **FIGURA 9.** Tabla 6 - Análisis univariante y multivariante de los factores asociados con la supervivencia y la recurrencia.

40 **FIGURA 10.** Análisis de la capacidad de clasificación de los sistemas de estadificación en la cohorte de ensayo. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de 110 pacientes de CHC basándose en la clasificación que predijo (FIG. 10A) la estadificación TNM, (FIG. 10B) estadificación OKUDA, (FIG. 10C) estadificación CLIP o (FIG. 10D) estadificación BCLC.

FIGURA 11. Una tabla que contiene un grupo de 22 miARN útiles para la predicción de CHC, [SEC. ID N^{os}: 1-22].

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

45 Se tiene que entender que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada, son solamente a modo de ejemplo y explicación y no intentan limitar el ámbito de las presentes enseñanzas. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que específicamente se establezca otra cosa.

El uso de la palabra “uno” o “una” cuando se usa junto con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar “uno”, pero también es coherente con el significado “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”.

50 También, el uso de “comprender”, “contener”, e “incluir”, o modificaciones en estas palabras raíces, por ejemplo pero sin limitarse a estos “comprende”, “contenido”, e “incluyendo”, no intentan ser limitantes. La expresión “y/o” significa que los términos anterior y posterior se pueden tomar juntos o separadamente. Con fines ilustrativos, pero no como

una limitación, "X y/o Y" puede significar "X" o "Y" o "X e Y".

Se entiende que un miARN se deriva de secuencias genómicas o de un gen. A este respecto, el término "gen" se usa por simplicidad para referirse a una secuencia genómica que codifica el precursor de miARN para un determinado miARN. Sin embargo, las realizaciones de la invención pueden implicar las secuencias genómicas de un miARN que esté implicado en su expresión, tales como un promotor y otras secuencias reguladoras.

El término "miARN" generalmente se refiere a una molécula de cadena sencilla, pero en realizaciones específicas, las moléculas implementadas en la invención también englobarán una región o una cadena adicional que es parcialmente (entre 10 y 50 % de complementariedad a lo largo de la longitud de la cadena), sustancialmente (más del 50 % pero menos del 100 % de complementariedad a lo largo de la longitud de la cadena) o totalmente complementario con otra región de la misma molécula de cadena única o con otro ácido nucleico. Por tanto, los ácidos nucleicos pueden englobar una molécula que comprende una o más cadenas complementarias o complementarias consigo mismas o "complemento(s)" de una secuencia particular que comprende una molécula. Por ejemplo, el precursor de miARN, puede tener una región que se complemente a sí misma con hasta un 100 % de complementariedad, el cual es una sonda miARN de la invención que puede ser o es al menos del 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 % complementaria con su diana.

La expresión "combinaciones de los mismos" como se utiliza en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los artículos enumerados que preceden a la expresión. Por ejemplo, "A, B, C, o combinaciones de las mismas" pretende incluir al menos una de A, B, C, AB, BC, o BA, CA, CB, ACB, CBA, BCA, BAC, o CAB.

Los microARN (miARN) son transcripciones de una nueva clase de genes pequeños no codificantes de ARN que son capaces de distinguir varios tipos de cánceres agresivos, incluyendo el carcinoma hepatocelular (CHC), de sus homólogos. Los pacientes con CHC tienen un pronóstico muy malo debido a la alta tasa de metástasis, y a que los sistemas actuales de estadificación no son capaces de determinar con precisión el pronóstico del paciente, especialmente en los primeros estadios de esta enfermedad. Los inventores investigaron si miARN únicos están asociados con el pronóstico y las metástasis en CHC.

Los inventores examinaron los perfiles de expresión de miARN en 490 especímenes provenientes de la resección radical de 244 pacientes con CHC. Los inventores descubrieron una firma única de un miARN basándose en 134 especímenes clínicamente bien definidos metastásicos y no metastásicos. La firma única se utilizó para predecir los resultados pronósticos de 110 especímenes de CHC independientes.

La firma del miARN compuesto por 20 oligonucleótidos únicos puede discriminar significativamente ($p < 0,001$) 30 tejidos primarios de CHC con metástasis venosa, de 104 CHC solitarios libres de metástasis por validación cruzada en una cohorte entrenada. Sin embargo, los miARN significativos no se pudieron identificar en los correspondientes tejidos hepáticos no cancerosos.

La firma de metástasis tumoral de mi ARN fue un factor de predicción significativo de la supervivencia del paciente ($p < 0,0023$) y la recurrencia ($p = 0,002$) en 89 CHC en primer estadio. Una firma compuesta por 4 miARN seleccionados tenía un poder de predicción similar. En particular, la expresión, que se correlacionaba con metástasis venosa y poca supervivencia, era alta en miR-219 [SEC ID N°: 20] y miR-207 [SEC ID N°: 18] y baja en miR-30c [SEC ID N°: 6], y miR124a [SEC ID N°: 4]. El modelo de riesgos proporcionales de Cox también reveló que esta firma fue superior a otras variables clínicas incluyendo los sistemas de estadificación conocidos, para predecir la supervivencia del paciente.

La firma única de miARN es útil para el pronóstico de CHC, particularmente en pacientes cuyo resultado es difícil de predecir por los sistemas de estadificación convencionales. Los ejemplos del presente documento muestran que la medición de ciertos niveles de miARN en el CHC tiene una utilidad clínica para la identificación precoz de pacientes que tienen la probabilidad de desarrollar metástasis y su posterior clasificación para un tratamiento apropiado.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención.

Ejemplo I

CHC y Afecciones Asociadas

Los tejidos hepáticos se obtuvieron de pacientes, que firmaron un consentimiento informado, que se sometieron a resección radical entre 2002 y 2003 en el Liver Cancer Institute and Zhongshan Hospital (Fudan University, Shanghai, China). El estudio fue aprobado por el Institutional Review Board of the Liver Cancer Institute y NIH. Los perfiles de expresión génica se llevaron a cabo en CHC primarios y en los correspondientes tejidos hepáticos no cancerosos de 244 pacientes chinos con CHC. Entre estos, el 93 % tenían cirrosis subyacente y el 68 % tenían un nivel de alfa-fetoproteína (AFP) > 20 ng/ml (Figura 4 – Tabla 1).

La estrategia general de repartición de los casos y el ensayo de la firma de miARN se muestra en la Figura 1. Un total de 134 casos bien definidos se utilizaron como grupo entrenado. Entre estos, 30 tenían lesiones de CHC

primario acompañadas de embolia tumoral que se encontraba en las ramas más importantes de la vena porta (n=25), la vena cava inferior (n=2) o el conducto biliar común (n=4; uno también tenía trombos tumorales en la vena cava inferior) y 104 tenían CHC solitario sin metástasis ni recurrencia que se encontrara en el seguimiento (3 años).

5 En los ensayos de validación, los inventores utilizaron un grupo de ensayo de 110 casos independientes (Figura 1: grupo de casos mal definidos) cuyos pronósticos no se podían determinar con precisión en el momento de la resección, por medio de varios sistemas de estadificación de CHC. Los casos de ensayo incluían 43 casos de CHC multinodular y 67 casos solitarios. De los 43 casos multinodulares de CHC 18 desarrollaron recurrencia intrahepática y uno desarrolló metástasis extrahepática además de la recurrencia intrahepática. De los 67 casos de CHC solitario, 4 tenían un tumor solitario con apariencia de nódulos agregados, 10 desarrollaron metástasis intra y/o extrahepática mientras que 49 desarrollaron recurrencia intrahepática confirmada en el seguimiento (3 años). Además, ocho tejidos hepáticos normales de pacientes libres de enfermedad [descritos en (16)] se incluyeron como controles normales.

15 **Aislamiento de ARN y matrices de miARN**

El aislamiento de ARN y la metodología de matrices de miARN fueron esencialmente como se describió previamente (13; 17). En el análisis de los 244 casos, el ARN se aisló de manera que se emparejaban tejido tumoral y no tumoral y las muestras se seleccionaron de manera aleatoria para el análisis de miARN para evitar agruparlos por preferencias. Se llevaron a cabo un total de 488 micromatrices (véase el Ejemplo II).

Análisis estadísticos:

25 Se llevó a cabo un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado con el software GENESIS versión 1.5, desarrollado por Alexander Sturn (IBMT-TUG, Graz, Austria). Se utilizó el software BRB ArrayTools V3.3 para el análisis supervisado, como se describió previamente (13; 16). Se utilizó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para comparar la supervivencia del paciente basándose en los resultados de la predicción, utilizando el software basado en Excel WinSTAT (<http://www.winstat.com>). Se generó el valor estadístico de p con el ensayo Cox-Mantel logrank. Se utilizó la regresión de riesgos proporcionales de Cox para analizar el efecto de dieciséis variables clínicas de la supervivencia del paciente o la recurrencia utilizando STATA 9.2 (College Station, TX) (véase el Ejemplo II). El significado estadístico se definió como $p < 0,05$. Los análisis TargetScan se basaron en una herramienta de la página web desarrollada por Ben Lewis (<http://genes.mit.edu/targetscan/index.html>) (véase el Ejemplo II) (41).

35 **Resultados:**

Búsqueda de la firma de un miARN para metástasis en tejidos con CHC

40 En una cohorte de 244 casos, los inventores compararon el CHC primario o los tejidos no cancerosos de 30 casos con metástasis venosa (M) y 104 casos no metastásicos (NM) por medio de una estrategia de comparación de clase supervisada (véanse los métodos en el Ejemplo II) (Figura 1, y Figura 4 – Tabla 1). Los inventores identificaron 20 miARN que podían discriminar los tejidos tumorales M de los de los casos NM. (Figura 2A y Figura 6 – Tabla 3).

45 Cuando se utilizaron los datos de la expresión de miARN en un tejido no canceroso, los inventores no pudieron identificar ningún miARN que fuera capaz de distinguir entre M y NM con el mismo nivel de significado estadístico (datos no mostrados). Por tanto, hay más cambios medibles en la expresión de miARN en los tejidos tumorales cuando se compara con los del microambiente hepático, lo que sugiere que el análisis de la expresión de miARN en los tejidos tumorales puede ser apropiado para diferenciar grupos de pacientes con CHC.

50 Además, los miARN significativos no podían identificarse cuando se hacía una comparación de estos tejidos con otras variables clínicas incluyendo el estado multinodular, la invasión microvascular y 4 sistemas de estadificación clínica (datos no mostrados). Por tanto, parecía que la expresión de ciertos miARN se correlacionaba con la metástasis solamente cuando la invasión microvascular era muy evidente. De los 20 miARN, 4 eran sobre-expresados en M mientras que 16 eran sobre-expresados en NM.

Composición y valor predictivo de una firma refinada de miARN de metástasis

60 Para determinar si la firma de los 20 miARN se relacionaba con el pronóstico de los pacientes, los inventores primero llevaron a cabo una predicción multivariada de la clase del vecino más próximo con un 10 % de validación cruzada y 1000 permutaciones. Este análisis dio como resultado una predicción estadísticamente significativa de metástasis con una precisión total del 76 % ($p=0,001$). Los resultados del análisis basado en la supervivencia de Kaplan-Meier revelaron que el grupo en el que se había hecho la predicción de metástasis tenía un periodo de supervivencia más corto cuando se comparaba con el grupo de no metástasis ($p < 0,042$) (Figura 2B). Por tanto esta firma se asocia con el pronóstico de los pacientes.

65

Para ensayar más la firmeza de la firma del miARN, los inventores ensayaron su capacidad para predecir un grupo independiente de casos de CHC, basándose en los resultados del grupo de entrenado de validación cruzada (Figura 1). Los inventores encontraron que el grupo de predicción M tenía una tasa de supervivencia significativamente menor que el grupo NM ($p=0,009$) (Figura 3A).

Utilizando una estrategia de reducción génica con varias combinaciones de miARN, los inventores encontraron que la predicción de supervivencia podía alcanzarse aún con solo 4 miARN: miR-219 [SEC ID N°: 20], miR-207 [SEC ID N°: 18], miR-30c [SEC ID N°: 6], y miR124a [SEC ID N°: 4] ($p=0,003$) (Figura 3B).

Parece ser que un incremento de la expresión de miR-219 [SEC ID N°: 20] y miR-207 [SEC ID N°: 18] y un descenso en la expresión de miR-30c [SEC ID N°: 6], y miR124a [SEC ID N°: 4] están asociadas con metástasis venosa de CHC y pronóstico (Figura 6 – Tabla 3).

Por el contrario, 4 sistemas de estadificación de CHC (es decir, TNM, OKUDA, CLIP o BCLC) no fueron capaces de predecir la supervivencia de los pacientes de esta cohorte de ensayo (Figura 6, Figura 3, Figura 7 – Tabla 4, Figura 8 – Tabla 5).

Como la capacidad de predecir el riesgo de diseminación del cáncer en los primeros estadios en el CHC pueden tener un impacto clínico significativo, los inventores también ensayaron la capacidad pronóstica de las firmas de los 20 o los 4 miARN para los pacientes de CHC en los primeros estadios (estadio TNM I o II; $n=89$). Al igual que en el grupo de ensayo entero, se observó una supervivencia significativamente peor en los pacientes que se predijeron como M en contra de los NM por ambas identificaciones de 20 o de 4 miARN en la cohorte en los primeros estadios ($p=0,022$ o $p=0,027$) (Figura 3C y D).

Además, los inventores también ensayaron la capacidad de las firmas para predecir la recurrencia en la cohorte de primer estadio y encontraron que el grupo que se predijo como M, basándose en la firma de los 20 o los 4 miARN tenía una tasa de recurrencia mayor ($p=0,002$ o $p=0,020$) que el grupo NM (Figura 3E y F, Figura 5 – Tabla 2).

Entre tanto los sistemas clínicos de estadificación fueron incapaces de predecir la supervivencia total o la libre de enfermedad en esta cohorte (Figura 5 – Tabla 2). Por tanto la firma de miARN que se identificó es un factor de predicción superior del resultado de un paciente con CHC, particularmente en el primer estadio de la enfermedad.

Comparación del factor de predicción de miARN y los sistemas conocidos de estadificación clínica

A continuación, los inventores llevaron a cabo el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox para determinar si el factor de predicción de miARN tenía una variable de confusión por las condiciones clínicas subyacentes en la cohorte de primer estadio. Un análisis univariante reveló que la firma de mi ARN era un factor de predicción significativo de la supervivencia y la recurrencia ($p=0,027$ y $p=0,002$, respectivamente) (Figura 5 – Tabla 2).

El modelo parsimonioso multivariante, que estaba controlado por las variables potenciales de confusión covariadas demostró que el factor de predicción de miARN estaba asociado con un incremento significativo de 3 veces del riesgo de muerte de los pacientes con perfil de expresión M frente a los de perfil de expresión NM (Figura 5 – Tabla 2).

El modelo parsimonioso multivariante de recurrencia, demostró que el factor de predicción de miARN estaba asociado con un incremento significativo de 2,8 veces de riesgo de recurrencia en el perfil de expresión M cuando se comparaba con el de NM (Figura 5 – Tabla 2) cuando se controlaba por variables potenciales de confusión. Los inventores también llevaron a cabo análisis de regresión de Cox en una cohorte de primer estadio determinada por la estadificación BCLC (Estado 0 y A) y en toda la cohorte de ensayo, y encontraron resultados similares (Figura 8 - Tabla 5 y Figura 9 – Tabla 6).

Por el contrario los sistemas de estadificación de CHC no fueron capaces de predecir el pronóstico de los pacientes y la recaída en la cohorte de ensayo (Figura 5 – Tabla 2 y Figura 8 – Tabla 5). Por tanto la firma del miARN es un factor de predicción independiente para supervivencia y recaída.

Análisis del Ejemplo I:

Una mayoría de los pacientes con CHC se diagnostican en un estadio tardío y solamente un pequeño porcentaje se ajusta a los criterios de resección y trasplante. El resultado de los pacientes con CHC ha sido menos que satisfactorio, en gran medida debido a la falta de un sistema de estadificación clínico simple, válido y universal, con un poder de predicción fuerte, especialmente para los pacientes en primeros estadios y para aquellos con un CHC solitario o multinodular que eventualmente metastatiza o recurre. Por tanto, una clave a alcanzar para mejorar el resultado del paciente con CHC es la detección y la clasificación precoces.

Los inventores han demostrado que la expresión de 20 miARN, o incluso de 4 miARN, puede predecir

significativamente la supervivencia de pacientes con CHC con tumores solitarios o multinodulares que desarrollan metástasis/recurrencia y pueden hacerlo eficazmente en pacientes de CHC con tumores relativamente pequeños que están en un estado primario de esta enfermedad. Por el contrario, los sistemas de estadificación clínicos fueron incapaces de distinguir el resultado de estos pacientes.

5 Los 4 miARN con mayor peso significativo de la firma no habían sido asociados con la progresión de ningún proceso maligno que se haya informado y pueden por tanto asociarse únicamente con CHC metastásico. Los inventores resaltan que mientras que los pacientes de esta cohorte con CHC multinodulares tienen una mejor tasa de supervivencia y recurrencia que los pacientes con CHC solitario, la asociación de estos resultados se asoció inversamente con el tipo nodular.

15 Las técnicas de análisis de aislamiento, amplificación y expresión para miARN están progresando rápidamente, incrementando la probabilidad de un perfil viable de miARN en el entramado clínico. Como los miARN se pueden utilizar para proporcionar mayor precisión en la clasificación de subtipos y los ejemplos en el presente documento muestran una mayor capacidad para distinguir las cohortes de pacientes clásicamente difíciles de predecir, el agrupamiento de los pacientes según su expresión de la firma del miARN puede tener una utilidad clínica. La identificación precoz de los pacientes con pronóstico malo (M) por la firma del miARN permite regímenes de tratamiento más personalizados, dirigidos o agresivos que los de los pacientes clasificados en el grupo con mejor pronóstico (NM).

20 Los miARN y/o la firma del miARN pueden utilizarse también para priorizar los pacientes de CHC que reciban un trasplante de hígado debido al suministro limitado de donantes disponibles y a la falta de un adecuado sistema de localización.

25 Otra ventaja es que, para un uso clínico óptimo y un diagnóstico potencialmente más eficaz, sería apropiado tener el mínimo número de genes que puedan discriminar los pacientes que es probable que desarrollen formas más agresivas de la enfermedad. Los inventores han demostrado que con sólo 4 miARN son capaces de discriminar significativamente pacientes de CHC que tienen un mal resultado. Por tanto estos miARN son herramientas prometedoras que pueden facilitar el diagnóstico de CHC, particularmente en pacientes en primeros estadios, y permitir un asesoramiento clínico y un tratamiento apropiados.

30 Los miARN y/o la firma del miR también pueden ser útiles para identificar dianas miARN candidatas que se expresan diferencialmente en pacientes que desarrollan metástasis/ recaída.

35 También estos miARN son útiles al proporcionar conocimientos sobre las consecuencias de la alteración del miARN en el CHC. Las firmas del miARN y/o miR también son útiles para desarrollar y/o servir como dianas terapéuticas para invertir el resultado potencial de los pacientes con un indicador de pronóstico malo definido por la clasificación miARN.

40 Otra ventaja de las firmas del miARN y/o miR es que son útiles en el desarrollo de procedimientos y/o composiciones para invertir el curso de la enfermedad. Tales posibilidades de reversión pueden ocurrir, por ejemplo, a través de las opciones de terapia génica para alterar la expresión de miARN o sus dianas. Otros ejemplos no limitativos incluyen la activación de fenotipos oncogénicos por oligonucleótidos antisentido sintéticos, generación de inhibidores específicos para anular la interacción miARN/gen diana o fenotipos supresores de sobre-expresión en el tumor utilizando un suministro vírico o liposómico.

45 0089 Los miARN y/o la firma del miR, son útiles para el diagnóstico precoz y el tratamiento de intervención asociado, y se pueden utilizar para cambiar las estrategias bastante fatalistas para el CHC. El identificador miARN desvelado en el presente documento puede por tanto utilizarse para clasificar los pacientes con CHC en un primer estadio, posibilitando su diagnóstico y mejorando el resultado clínico.

Ejemplo II

VHB y afecciones hepáticas asociadas

55 El criterio de selección de muestras incluía los que tenían una historia de infección por virus de hepatitis B (VHB), o cirrosis hepática relacionada con VHB, con CHC diagnosticado por dos patólogos independientes, con información detallada de la presentación clínica y características patológicas; y datos detallados de seguimiento por al menos 3 años, los cuales incluían recurrencia intrahepática, metástasis venosa intrahepática, implicación de los ganglios linfáticos, metástasis extrahepática, curación y supervivencia total, así como causa de la muerte.

60 La clasificación TNM actualizada es superior a otros sistemas de estadificación, incluyendo CLIP y OKUDA para los pacientes con CHC que se someten a la resección y que son por tanto elegidos como del estrato de pacientes en primer estadio (estadio TNM I y II) para el análisis de la capacidad de predicción del miARN (1; 2). Como un estudio prospectivo reveló que el sistema BCLC era superior que el nuevo sistema de clasificación TNM actualizado en 2002; los inventores también llevaron a cabo un modelo de riesgos proporcionales de Cox basándose en los

pacientes de primer estadio categorizados por BCLC (Estadio 0 y A).

Matrices miARN:

5 La plataforma de micromatriz miARN (V 2.0) se compuso con 250 miARN humanos no redundantes y con 200 de ratón y las matrices se llevaron a cabo en el Microarray Shared Resource, Comprehensive Cancer Center en la Ohio State University. Para examinar la robustez de la plataforma de matriz de miARN, los inventores analizaron primero si la expresión de miARN podía diferenciar entre 244 tejidos de CHC de sus tejidos hepáticos emparejados circundantes no cancerosos (Figura 4 – Tabla 6).

10 Utilizando un procedimiento de comparación de clase supervisada con un t-test univariante pareado y un ensayo multivariante con 1000 permutaciones del marcador de clase con la tasa de falso descubrimiento ajustada a <1 con una confianza del 99 %, los inventores identificaron 209 miARN no redundantes que podían discriminar significativamente tejidos tumorales CHC (T) de sus tejidos emparejados no tumorales (NT) (datos no mostrados).

15 Estos miARN significativos separaban claramente las muestra T y NT, ilustrados por el análisis de agrupamiento jerárquico (datos no mostrados), Los análisis de algoritmo de predicción de clase multivariante con un 10 % de validación cruzada y 100 permutaciones aleatorias indicaban que estos miARN pueden proporcionar una predicción estadísticamente significativa de las muestras T y NT ($p<0,01$) con una precisión de >97 % por el predictor del vecino más cercano (datos no mostrados). Estos análisis iniciales indicaban que las matrices de miARN eran robustas y que podían identificar una diferencia significativa entre el tumor y los tejidos hepáticos no cancerosos. El mismo procedimiento se utilizó para comparar los casos de metástasis (M) y no metástasis (NM).

Análisis estadísticos:

25 Se utilizó la regresión de riesgos proporcionales de Cox para analizar el efecto de las variables clínicas en la supervivencia total y libre de recaídas del paciente, incluyendo la edad, el sexo, el estado de VHB activo, la alfa-fetoproteína (AFP) prerresección, la cirrosis, la alanin-transferasa (ALT), la puntuación de Child-Pugh, el tamaño del tumor, la encapsulación del tumor, el tipo nodular, el estado de la invasión microvascular, el grado de Edmondson y varios sistemas de estadificación del pronóstico de CHC incluyendo la estadificación BCLC (3), la clasificación CLIP (4), la estadificación de Okuda (5), o la clasificación TNM (AJCC/UICC, 6ª Edición) (6). Se utilizó un ensayo univariante para examinar la influencia del factor de predicción miARN o cada variable clínica sobre la supervivencia del paciente o la recurrencia para el grupo de ensayo entero ($n=110$; Figura 8 – Tabla 5 y Figura 9 – Tabla 6) o el del CHC en primeros estadios ($n=89$; Figura 5 – Tabla 2).

35 Se llevó a cabo un análisis multivariante para estimar la relación de riesgos del factor de predicción miARN mientras se controlaban las variables clínicas identificadas por un proceso de selección gradual utilizando rutinas de adición hacia adelante y selección hacia atrás con un significado establecido en una $p<0,05$. Además, la relación de riesgos para el factor de predicción miARN sola, se comparó con la relación de riesgos para el factor de predicción miARN con cada una de las variables clínicas. Si se observaba un cambio de un 10 % en la relación de riesgos del factor de predicción con la adición de una única covariante, esta variable se controlaba en el modelo final de riesgos proporcionales de Cox.

45 Para el grupo de ensayo completo se estableció el modelo de supervivencia más parsimonioso incluyendo los 20 factores de predicción miARN, el tamaño del tumor, el estado multinodular y la estadificación TNM mientras que el modelo de recurrencia más parsimonioso incluía los 20 factores de predicción miARN, el estado multinodular, la estadificación TNM, la estadificación BCLC y la estadificación Okuda. Para el grupo de primer estadio de CHC se estableció que, el modelo de supervivencia más parsimonioso incluía los 20 factores de predicción miARN, la AFP, la cirrosis, tamaño del tumor, estado multinodular, invasión microvascular y estadificación TNM mientras que el modelo de recurrencia más parsimonioso incluía los 20 factores de predicción miARN, el tamaño tumoral, el estado multinodular y la estadificación TNM.

50 Se evaluó la multicolinealidad de las covariantes y se encontró que no estaban presentes y se determinó que todos los modelos finales convergían en la suposición de riesgos proporcionales. El significado estadístico se definió como $p<0,05$. Los inventores hacen hincapié en que el análisis de clase univariante de Child-Pugh podría no ser analizado con precisión debido al pequeño tamaño de la muestra con esta covariante al compararse con otras variables clínicas evaluadas en esta cohorte.

60 Para proporcionar un sentido de confianza en esta lista de potenciales dianas miARN generadas por la estrategia bioinformática TargetScan, los inventores restringen la búsqueda enfocando las dianas potenciales miARN que formaban parte de los 153 genes del tumor CHC indicadores de metástasis venosa identificados recientemente (7) y que tienen una puntuación FDR baja ($<0,3$).

65 Los inventores además limitaron la salida a solo aquellas dianas celulares potenciales en las que la expresión en CHC era inversamente proporcional a la del correspondiente miARN. Un sumario de estas dianas hospedadoras basadas en los criterios de búsqueda descritos anteriormente se incluyen en la Figura 6 – Tabla 3.

La Figura 10 muestra un análisis de la capacidad de clasificación de los sistemas de estadificación en la cohorte de ensayo. Los análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de 110 pacientes con CHC basándose en la clasificación que se predijo por (A) estadificación TNM, (B) estadificación OKUDA, (C) estadificación CLIP o (D) estadificación BCLC.

Ejemplo III

En un aspecto particular se desvela en el presente documento un procedimiento para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un carcinoma hepatocelular (CHC). El procedimiento generalmente incluye la medición del nivel de al menos un producto génico del miR en una muestra de ensayo del sujeto y la determinación de si existe una alteración en el producto génico del miR en la muestra de ensayo, en relación al nivel de un producto génico del miR correspondiente en una muestra control, lo que es indicativo de que el sujeto o tiene, o está en riesgo de desarrollar, CHC. En ciertas realizaciones, el nivel de al menos un producto génico del miR se mide utilizando el análisis de transferencia de Northern. También en ciertas realizaciones, el nivel de al menos un producto génico del miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del correspondiente producto génico del miR en la muestra control, y/o el nivel de al menos un producto génico del miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del correspondiente producto génico del miR en la muestra control.

En ciertas realizaciones, el producto génico del miR comprende una o más de las SEC. ID N^{os} 1-22, como se muestra en la Figura 11. En ciertas realizaciones en particular, un producto génico del miR comprende una o más de: miR-219 [SEC ID N^o: 20], miR-207 [SEC ID N^o: 18], miR-30c [SEC ID N^o: 6], y miR124A [SEC ID N^o: 4].

Ejemplo IV

Medición de los productos génicos del miR

El nivel de al menos un producto génico del miR se puede medir por transcripción inversa de ARN de una muestra de ensayo obtenida de un sujeto para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana; hibridando los oligodesoxinucleótidos diana en una micromatriz que comprende sondas específicas de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y, comparando el perfil de hibridación de la muestra de ensayo generada con respecto a la de una muestra control. Una alteración en la señal de al menos un miARN es indicativa de que el sujeto o tiene, o está en riesgo de desarrollar, CHC.

Ejemplo V

Aplicaciones terapéuticas y diagnósticas

En otro aspecto, se desvelan en el presente documento procedimientos para el tratamiento de CHC en un sujeto, en donde la señal de al menos un miARN, en relación con la señal generada por una muestra control, está desregulada (por ejemplo, regulada negativa y/o positivamente).

En ciertas realizaciones, el producto génico del miR comprende una o más de las SEC. ID N^{os}: 1 – 22 como muestra la Figura 11. En ciertas realizaciones en particular, un producto de un gen miR comprende uno o más de: miR-219 [SEC ID N^o: 20], miR-207 [SEC ID N^o: 18], miR-30c [SEC ID N^o: 6], y miR124A [SEC ID N^o: 4] y combinaciones de los mismos.

También se desvelan en el presente documento procedimientos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un CHC asociado con uno o más marcadores de pronóstico malo en un sujeto, por transcripción inversa de ARN en una muestra de ensayo obtenida de un sujeto que proporciona una serie de oligodesoxinucleótidos diana; hibridando los oligodesoxinucleótidos en una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y, comparando el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado por una muestra control. Una alteración en la señal es indicativa de que el sujeto o tiene, o está en riesgo de desarrollar, el cáncer.

También se desvelan en el presente documento procedimientos de tratamiento de CHC en un sujeto que tiene CHC en el que al menos un producto génico del miR está regulado negativa o positivamente en las células cancerígenas del sujeto con respecto a las células del control. Cuando uno o más productos génicos del miR están regulados negativamente en las células cancerígenas, el procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un producto génico aislado del miR, de forma que la proliferación de las células cancerígenas se inhiba. Cuando uno o más de los productos génicos del miR están regulados positivamente en las células cancerígenas, el procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto génico del miR, de forma que la proliferación de las células cancerígenas en el sujeto se inhiba. En ciertas realizaciones, al menos un producto génico aislado del miR se selecciona de: miR-219 [SEC ID N^o: 20], miR-207 [SEC ID N^o: 18], miR-30c [SEC ID N^o: 6], y miR124A [SEC ID N^o: 4] y combinaciones de los mismos.

También se desvelan en el presente documento procedimientos de tratamiento del CHC en un sujeto, que comprenden: determinar la cantidad de al menos un producto génico del miR en las células CHC, en relación a las células del control; y, alterar la cantidad de producto génico del miR expresado en las células del CHC: administrando al sujeto una cantidad eficaz de al menos un producto génico aislado del miR, si la cantidad del producto génico del miR expresado en las células cancerígenas es menor que la cantidad del producto génico del miR expresado en las células del control; o administrando al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto génico del miR, si la cantidad del producto génico del miR expresado en las células cancerígenas es mayor que la cantidad de producto génico del miR expresado en las células del control, de forma que la proliferación de las células cancerígenas en el sujeto se inhiba. En ciertas realizaciones, el producto génico del miR comprende una o más de las SEC. ID N^{os}: 1 – 22 como muestra la Figura 11. En ciertas realizaciones en particular, un producto de un gen miR comprende uno o más de: miR-219 [SEC ID N^o: 20], miR-207 [SEC ID N^o: 18], miR-30c [SEC ID N^o: 6], y miR124A [SEC ID N^o: 4] y combinaciones de los mismos.

Ejemplo VI

15 Composiciones

También se desvelan en el presente documento composiciones farmacéuticas para tratar el CHC, que comprenden al menos un producto génico aislado del miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico aislado del miR que corresponde a un producto génico del miR que está regulado negativamente en las células del CHC en relación a las células del control adecuado. En ciertas realizaciones, el producto génico del miR comprende una o más de las SEC. ID N^{os}: 1 – 22 como muestra la Figura 11. En ciertas realizaciones en particular, un producto de un gen miR comprende uno o más de: miR-219 [SEC ID N^o: 20], miR-207 [SEC ID N^o: 18], miR-30c [SEC ID N^o: 6], y miR124A [SEC ID N^o: 4] y combinaciones de los mismos.

En otra realización particular, la composición farmacéutica comprende al menos un compuesto regulador de la expresión de miR (por ejemplo, un inhibidor) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se desvelan en el presente documento composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un compuesto regulador de la expresión de miR que es específico para un producto génico del miR que está regulado negativa o positivamente en las células CHC con respecto a las células del control adecuado.

También se desvelan en el presente documento procedimientos para identificar un agente anti CHC, que comprende la provisión de un agente de ensayo a una célula y la medición del nivel de al menos un producto génico del miR asociado con la disminución de los niveles de expresión en las células CHC, en donde un incremento en el nivel del producto génico del miR con respecto al control celular adecuado, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti CHC. En ciertas realizaciones, el producto génico del miR comprende una o más de las SEC. ID N^{os}: 1 – 22 como muestra la Figura 11. En ciertas realizaciones en particular, un producto de un gen miR comprende uno o más de: miR-219 [SEC ID N^o: 20], miR-207 [SEC ID N^o: 18], miR-30c [SEC ID N^o: 6], y miR124A [SEC ID N^o: 4] y combinaciones de los mismos.

También se desvelan en el presente documento procedimientos para identificar un agente anti CHC, que comprenden la provisión de un agente de ensayo a una célula y la medición del nivel de al menos un producto génico del miR asociado con niveles aumentados de la expresión en las células CHC, donde un descenso en el nivel del producto génico del miR en la célula, con respecto a un control celular adecuado, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti CHC. En una realización en particular, el producto génico del miR se selecciona del grupo que consiste en: miR-219 [SEC ID N^o: 20], miR-207 [SEC ID N^o: 18], miR-30c [SEC ID N^o: 6], y miR124A [SEC ID N^o: 4] y combinaciones de los mismos.

Ejemplo VII

45 Kits

Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento puede comprenderse en un kit. En un ejemplo no limitativo, los reactivos para aislar el miARN, marcar el miARN, y/o evaluar una población miARN utilizando una matriz están incluidos en un kit. El kit puede incluir además reactivos para crear o sintetizar sondas de miARN. Los kits por tanto comprenderán, un medio adecuado de envase, una enzima para marcar el miARN incorporando un nucleótido marcado o nucleótidos no marcados que son marcados posteriormente. Puede incluir también uno o más tampones, tales como tampones de reacción, tampones de marcado, tampones de lavado, o un tampón de hibridación, compuestos para preparar las sondas de miARN, y componentes para aislar el miARN. Otros kits pueden incluir componentes para hacer una matriz de ácido nucleico que comprenda oligonucleótidos complementarios a miARN, y por tanto, puede incluir, por ejemplo un soporte sólido.

Para cualquier realización de kit, incluyendo una matriz, puede haber moléculas de ácido nucleico que contengan una secuencia que es idéntica o complementaria en todo o en parte a cualquiera de las SEC. ID N^{os}: 1 – 22.

Los componentes de los kits pueden envasarse tanto en medio acuoso como en forma liofilizada. El medio de envase de los kits, generalmente incluye al menos un vial, un tubo de ensayo, un matraz, botella, jeringa u otro medio de envase, en el cual se puede colocar un componente, y preferiblemente, adecuadamente separado en alícuotas. Cuando hay más de un componente en el kit (reactivo marcador y marcador se pueden envasar juntos), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro envase adicional en el que se pueden colocar por separado los componentes adicionales. Sin embargo, pueden estar comprendidas en un vial varias combinaciones de componentes. Los kits desvelados en el presente documento también son normalmente incluidos en medios para contener ácidos nucleicos, y cualquier otro envase de reactivos en un confinamiento estrecho para la venta comercial. Tales envases pueden incluir envases de plástico inyectado o moldeado por soplado en los cuales se retienen los viales deseados.

Cuando los componentes de un kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, siendo preferible una solución acuosa estéril. Otras soluciones que se pueden incluir en un kit son aquellas soluciones que implican un miARN aislado y/o enriquecido en una muestra mezclada.

Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse en forma de polvo seco. Cuando los reactivos y/o los componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir con la adición de un disolvente adecuado. Se puede concebir que el disolvente también se proporcione en otro medio de envase. Los kits pueden también incluir componentes que facilitan el aislamiento del miARN marcado. También puede incluir componentes que preserven o mantengan el miARN o que lo protejan de la degradación. Los componentes pueden estar libres de ARNasa o protegidos contra las ARNasas.

También, los kits pueden comprender en general, en medios adecuados, distintos envases para cada solución y reactivo individual. El kit puede también incluir instrucciones para el empleo de los componentes del kit así como el uso de cualquier otro reactivo no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que se pueden implementar. Se contempla que tales reactivos son realizaciones de los kits desvelados en el presente documento. También, los kits no se limitan a los artículos particulares identificados anteriormente y pueden incluir cualquier reactivo utilizado para la manipulación o la caracterización del miARN.

También se contempla que cualquier realización tratada en el contexto de una matriz de miARN se puede emplear más generalmente en procedimientos de revisión o evaluación por perfil o en los kits desvelados en el presente documento. En otras palabras, cualquier realización descrita que se pueda incluir en una matriz particular se puede practicar en el contexto de una evaluación por perfil de miARN más general y no necesita implicar una matriz *per se*.

También se contempla que cualquier kit, matriz u otra técnica de detección o herramienta, o cualquier procedimiento puede implicar la evaluación por perfil para cualquiera de estos miARN. También, se contempla que cualquier realización tratada en el contexto de una matriz miARN se pueda implementar con o sin el formato de matriz de los procedimientos desvelados en el presente documento; en otras palabras, cualquier miARN en una matriz de miARN se puede revisar o evaluar en cualquier procedimiento desvelado en el presente documento por cualquier técnica que sea conocida por los expertos en la técnica. El formato de matriz no se necesita para implementar la revisión y los procedimientos diagnósticos.

Los kits para el uso de las matrices de miARN para aplicaciones terapéuticas, pronósticas, o diagnósticas y tales usos, se contemplan en el presente documento. Los kits pueden incluir una matriz miARN, así como la información relativa al perfil de referencia o normalizado de miARN para los miARN en la matriz. También, en ciertas realizaciones, se pueden incluir en el kit, un ARN o ADN control. El ARN control puede ser un miARN que se puede utilizar como un control positivo para marcar y/o para el análisis de matriz.

Los procedimientos y kits de las enseñanzas presentes se han descrito amplia y genéricamente en el presente documento. Cada una de las especies más concretas y de los agrupamientos sub-genéricos que caen en la divulgación genérica también forma parte de las presentes enseñanzas. Esto incluye la descripción genérica de las enseñanzas presentes con la condición o la limitación negativa de eliminar cualquier materia de estudio del género, con respecto a si el material extirpado está relatado específicamente en el presente documento o no.

Ejemplo VIII

Preparación de la matriz y evaluación

También se desvela en el presente documento la preparación y uso de matrices de miARN, que se ordenan como macromatrices o micromatrices de moléculas de ácidos nucleicos (sondas) que son totalmente o casi complementarias o idénticas a una pluralidad de moléculas de miARN o moléculas precursoras de miARN y que están colocadas sobre un material de soporte con una organización espacial separada. Las macromatrices normalmente son hojas de nitrocelulosa o nylon en las que se sitúan las sondas. En las micromatrices se posicionan las sondas de ácidos nucleicos más densamente hasta 10.000 moléculas de ácidos nucleicos se pueden ajustar en una región normalmente de 1 a 4 centímetros cuadrados. Las micromatrices se pueden fabricar situando moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, genes, oligonucleótidos, etc., en sustratos o secuencias fabricadas de oligonucleótidos *in situ* sobre un sustrato. Las moléculas de ácidos nucleicos fabricadas o situadas se pueden aplicar en un patrón de matriz de alta densidad de hasta aproximadamente 20 moléculas de ácidos nucleicos no idénticos

por centímetro cuadrado o más, por ejemplo hasta aproximadamente 100 o incluso 1000 por centímetro cuadrado. Las micromatrices utilizan normalmente cristal revestido como soporte sólido, al contrario que el material basado en nitrocelulosa de las matrices de filtro. Teniendo una matriz ordenada de muestras de ácidos nucleicos complementarios de miARN, la posición de cada muestra se puede seguir y unirse a la muestra original. Una
 5 variedad de diferentes dispositivos de matriz en los que una pluralidad de distintas sondas de ácidos nucleicos está asociada establemente con la superficie de un soporte sólido es conocida por los expertos en la técnica. Los sustratos útiles para matrices incluyen nylon, cristal y silicona. Las matrices pueden variar en varias formas diferentes, incluyendo la longitud media de la sonda, la secuencia o tipos de sonda, la naturaleza del enlace entre la sonda y la superficie de la matriz, por ejemplo, covalente, no covalente, y similares. El marcado y los procedimientos
 10 de revisión descritos en el presente documento y las matrices no están limitados en su utilidad con respecto a cualquier parámetro excepto que las sondas detecten el miARN; en consecuencia, los procedimientos y composiciones se pueden usar con una variedad de diferentes tipos de matriz de miARN. En ciertas realizaciones, el producto génico del miR comprende una o más de las SEC. ID N^{os}: 1 – 22 como muestra la Figura 11. En ciertas realizaciones en particular, un producto de un gen miR comprende uno o más de: miR-219 [SEC ID N^o: 20], miR-207
 15 [SEC ID N^o: 18], miR-30c [SEC ID N^o: 6], y miR124A [SEC ID N^o: 4].

Referencias

Referencias para ejemplo I

- (1) Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31(4):339-346.
- 20 (2) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
- (3) Yuki K, Hirohashi S, Sakamoto M, Kanai T, Shimosato Y. Growth and spread of hepatocellular carcinoma. A review of 240 consecutive autopsy cases. *Cancer* 1990; 66(10):2174-2179.
- (4) Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):563-572.
- 25 (5) Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-Cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001; 7(4):445-454.
- (6) Nakakura EK, Choti MA. Management of hepatocellular carcinoma. *Oncology (Huntingt)* 2000; 14(7):1085-1098.
- (7) Wildi S, Pestalozzi BC, McCormack L, Clavien PA. Critical evaluation of the different staging systems for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2004; 91(4): 400-408.
- 30 (8) Okuda K, Ohtsuki T, Obata H et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985; 56(4):918-928.
- (9) Levy I, Sherman M. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda, and Child-Pugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. *Gut* 2002; 50(6):881-885.
- (10) Farinati F, Rinaldi M, Gianni S, Naccarato R. How should patients with hepatocellular carcinoma be staged? Validation of a new prognostic system. *Cancer* 2000; 89(11):2266-2273.
- 35 (11) Kudo M, Chung H, Osaki Y. Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (MS score). *J Gastroenterol* 2003; 38(3):207-215.
- (12) Cillo U, Bassanello M, Vitale A et al. The critical issue of hepatocellular carcinoma prognostic classification: which is the best tool available? *J Hepatol* 2004; 40(1):124-131.
- 40 (13) Ye QH, Qin LX, Forgues M et al. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2003; 9(4):416-423.
- (14) Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H et al. Oligonucleotide microarray for prediction of early intra-hepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* 2003; 361(9361):923-929.
- 45 (15) Lee JS, Chu IS, Heo J et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004; 40(3): 667-676.
- (16) Budhu A, Forgues M, Ye QH et al. Prediction of venous metastases, recurrence and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell* 2006; 10(2):99-111.
- 50 (17) Calin GA, Ferracin M, Cimmino A et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353(17):1793-1801.

- (18) Calin GA, Liu CG, Sevignani C et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(32):111755-11760.
- (19) Lu J, Getz G, Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043):834-838.
- 5 (20) Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543):862-864.
- (21) Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543):858-862.
- (22) Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294(5543):853-858.
- 10 (23) Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17(24):3011-3016.
- (24) Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res* 2005; 65(9):3509-3512.
- (25) Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21(17):4663-4670.
- 15 (26) Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297(5589):2056-2060.
- (27) Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39(2):167-169.
- 20 (28) Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64(11):3753-3756.
- (29) Michael MZ, O'Connor SM, Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1(12):882-891.
- [(30) Iorio MV, Ferracin M, Liu CG et al. Micro-RNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16):7065-7070.
- 25 (31) Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(24): 15524-15529.
- (32) Sonoki T, Iwanaga E, Mitsuya H, Asou N. Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005; 19(11):2009-2010.
- 30 (33) Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005.
- (34) Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. Micro-RNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65(14):6029-6033.
- 35 (35) Johnson SM, Grosshans H, Shingara J et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120(5):635-647.
- (36) Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65(21):9628-9632.
- (37) Meng F, Henson R, Lang M et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130(7):2113-2129.
- 40 (38) Volinia S, Calin GA, Liu CG et al. A micro-RNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(7):2257-2261.
- (39) Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 2003; 113(6):673-676.
- 45 (40) Yanaihara N, Caplen N, Bowman E et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9(3):189-198.
- (41) Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120(1):15-20.

Referencia para ejemplo II

- (1) Varotti G, Ramacciato G, Ercolani G et al. Comparison between the fifth and sixth editions of the AJCC/UICC TNM staging systems for hepatocellular carcinoma: multicentric study on 393 cirrhotic resected patients. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31(7):760-767.
- 5 (2) Huang YH, Chen CH, Chang TT et al. Evaluation of predictive value of CLIP, Okuda, TNM and JIS staging systems for hepatocellular carcinoma patients undergoing surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20(5):765-771.
- (3) Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepa-tocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19(3):329-338.
- 10 (4) The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. A new prognostic system for hepa-tocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 1998; 28(3):751-755.
- (5) Okuda K, Ohtsuki T, Obata H et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985; 56(4):918-928.
- 15 (6) International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours, 6th Edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2002.
- (7) Ye QH, Qin LX, Forgues M et al. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2003; 9(4):416-423.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> UNIVERSIDAD DEL ESTADO DE OHIO
- 20 <120> FIRMA DE EXPRESIÓN DEL MICROARN PARA PREDECIR LA SUPERVIVENCIA Y LA METÁSTASIS EN EL CARCINOMA HEPATOCELULAR
- <130> 53-28356
- <140>
- <141>
- 25 <150> 60/855.895
- <151> 01-11-2006
- <160> 22
- <170> PatentIn versión 3.3
- 30 <210> 1
- <211> 22
- <212> ARN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- ucguaccgug aguaaauaug cg 22
- 35 <210> 2
- <211> 22
- <212> ARN
- <213> Homo sapiens
- <400> 2
- 40 uggaguguga caaugguguu ug 22
- <210> 3
- <211> 22
- <212> ARN
- <213> Homo sapiens
- 45 <400> 3
- ucagugcauc acagaacuuu gu 22
- <210> 4
- <211> 20

ES 2 425 416 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 4
 uaaggcacgc ggugaaugcc 20

 5 <210> 5
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 5
 10 uguaacagca acuccaugug ga 22

 <210> 6
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 6
 uguaaacauc cuacacucuc agc 23

 <210> 7
 <211> 22
 <212> ARN
 20 <213> Homo sapiens

 <400> 7
 uguaaacauc cucgacugga ag 22

 <210> 8
 <211> 22
 <212> ARN
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 ucagugcacu acagaacuuu gu 22

 <210> 9
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 9
 uguaaacauc cuugacugga ag 22

 35 <210> 10
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 40 uggcaguguc uuagcugguu gu 22

 <210> 11
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 45 <400> 11
 ugagguagua guuuguacag uu 22

 <210> 12
 <211> 22
 <212> ARN
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 uccugagac ccuaacuugu ga 22

<210> 13
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 13
 uggaauguaa agaaguaugu au 22

<210> 14
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 14
 ugugcaaauc uaugcaaac uga 23

<210> 15
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 15
 uagcagcaca uaaugguuug ug 22

<210> 16
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 16
 ucuuugguua ucuagcugua uga 23

<210> 17
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 17
 uggagagaaa ggcaguuccu ga 22

<210> 18
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 18
 gcuucuccug gcucuccucc cuc 23

<210> 19
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

35 <400> 19
 ugauugucca aacgcaauuc u 21

<210> 20
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 20
 agaguugagu cuggacgucc cg 22

<210> 21
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

45 <400> 21
 agaguugagu cuggacgucc cg 22

<210> 21
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 21
 agaguugagu cuggacgucc cg 22

<400> 21
aacaauaucc uggugcugag ug 22

5
<210> 22
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 22
uccagcauca gugauuuugu ug 22

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir la supervivencia de un sujeto con carcinoma hepatocelular (CHC), que comprende la medición del nivel de un producto génico de un miR en una muestra de ensayo de células tumorales del sujeto, en el que una alteración en el nivel del producto génico del miR en la muestra de ensayo, en relación con el correspondiente nivel de un producto génico del miR en una muestra control de tejido CHC libre de metástasis, es indicativa de la supervivencia del sujeto en el que el producto génico del miR comprende: miR-30c [SEC. ID N°: 6], miR-124a [SEC. ID N°: 4], miR-207 [SEC. ID N°: 18] y miR-219 [SEC. ID N°: 20], y en donde dicha alteración comprende el aumento de la expresión de los niveles de miR-219 [SEC. ID N°: 20] y miR-207 [SEC. ID N°: 18] y la disminución de los niveles de miR-30c [SEC. ID N°: 6] y miR-124a [SEC. ID N°: 4], lo que se correlaciona con baja supervivencia.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el producto génico del miR además comprende: miR-338, miR-185, miR-1-2, miR-19a, miR-34a, miR-9-2, miR-122a, miR-148a, miR-125b-2, miR-15a, miR-30e, miR-148b, miR-194, miR-30a, miR-126 y miR-let-7g.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la predicción de supervivencia está determinada por un análisis de predicción de clase utilizando los siguientes algoritmos: indicador de covariante compuesta, análisis discriminador lineal, vecino más próximo y máquinas de vectores de soporte.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la predicción de la supervivencia se determina con el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.
5. Un kit para generar un perfil de miARN para una muestra que, en medios de envase adecuados, consiste en
- a). Sondas miARN que tienen secuencias que codifican miARN para: miR-30c, miR-124a, miR- 207 y miR-219; o
b). Sondas miARN que tienen secuencias que codifican miARN para: miR-30c , miR-124a , miR- 207, miR-219 , miR-338, miR-185, miR-1-2, miR-19a, miR-34a, miR-9-2, miR-122a, miR-148a, miR-125b-2, miR-15a, miR-30e, miR-148b, miR-194, miR-30a, miR-126, y miR-let-7g

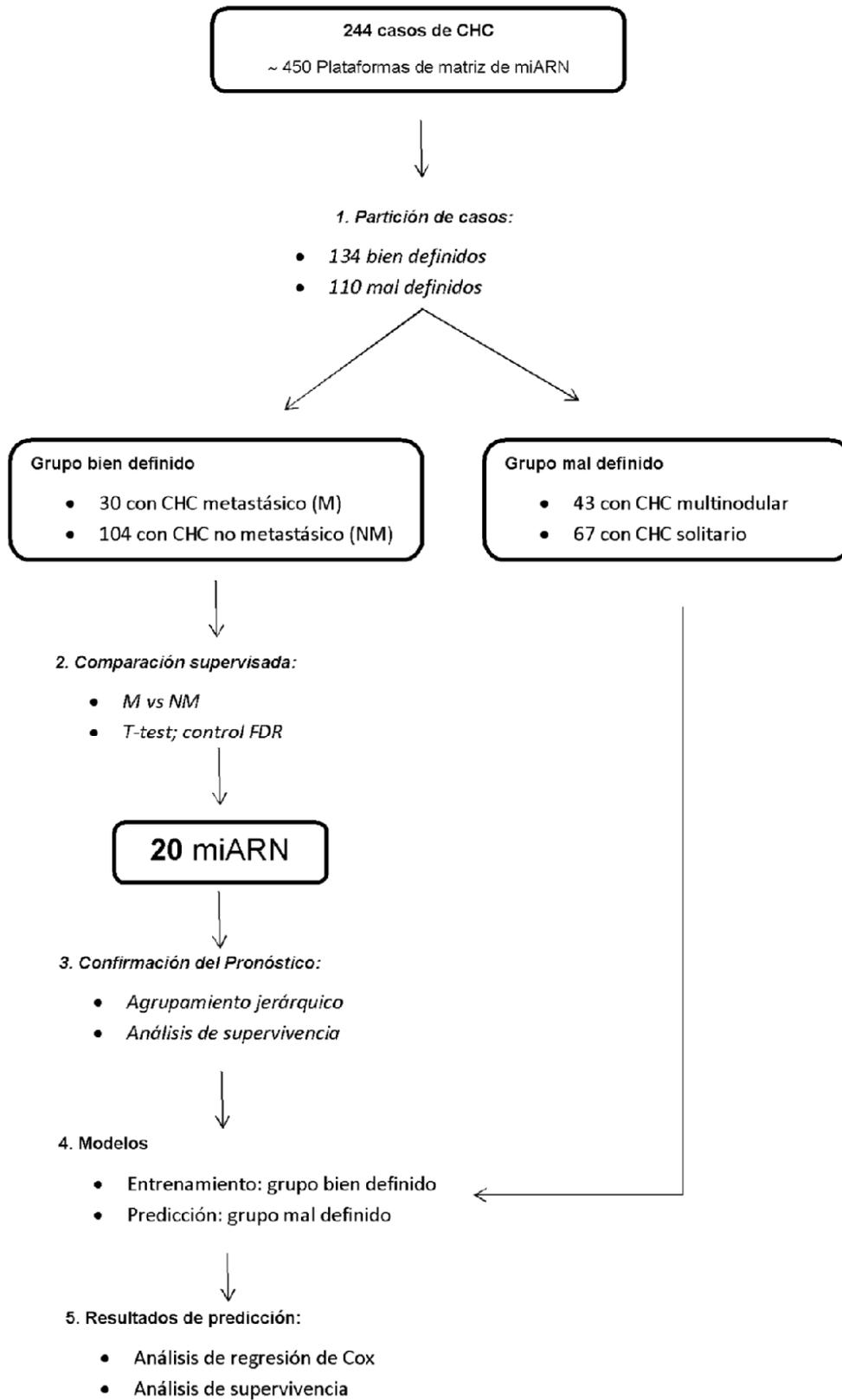


Fig. 1

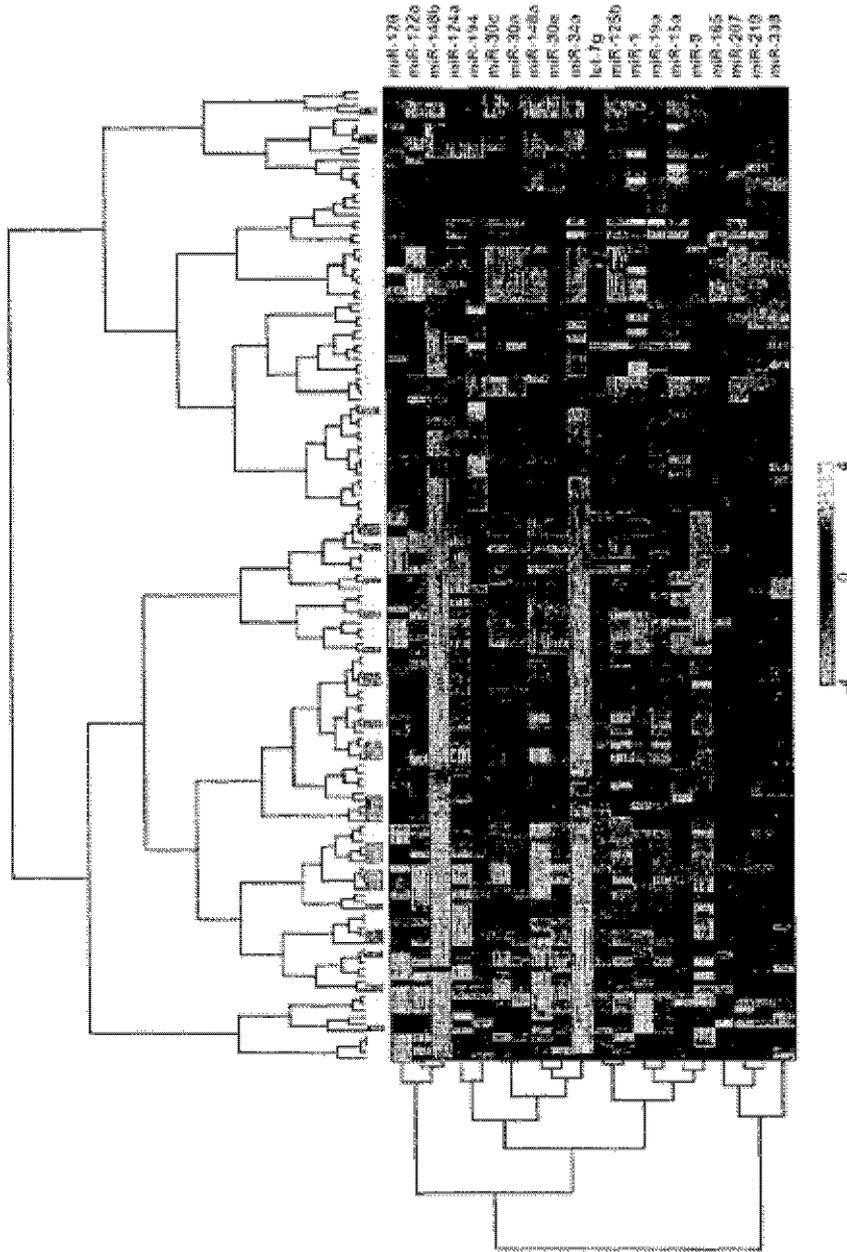


Fig. 2A

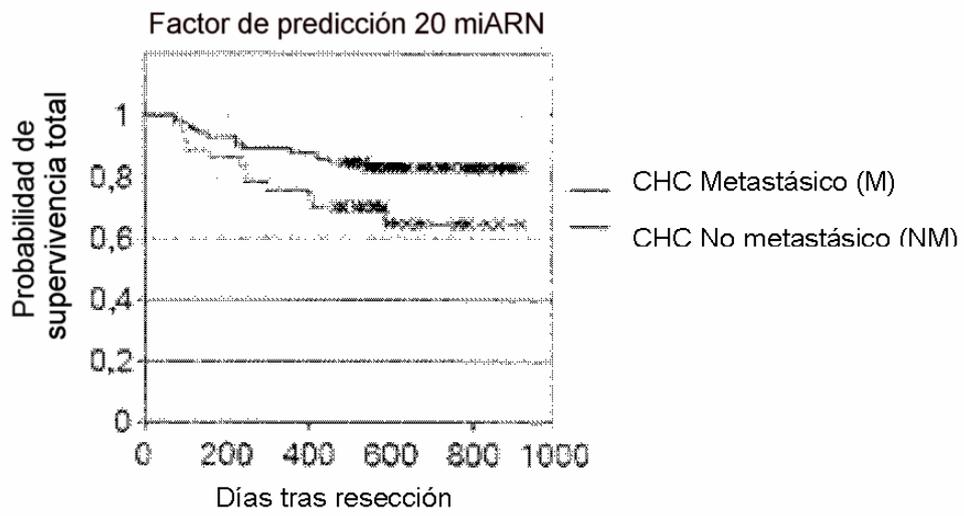


Fig. 2B

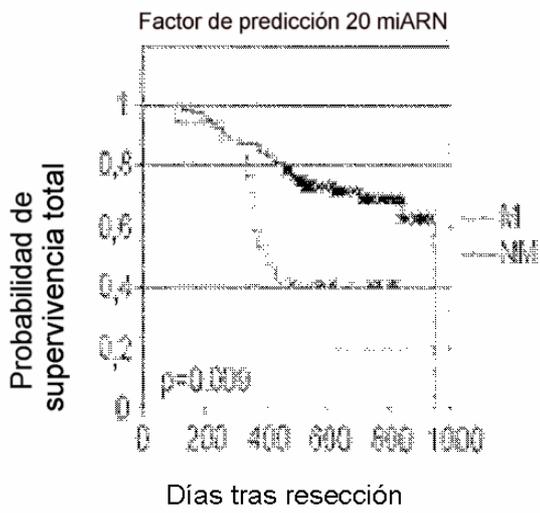


Fig. 3A

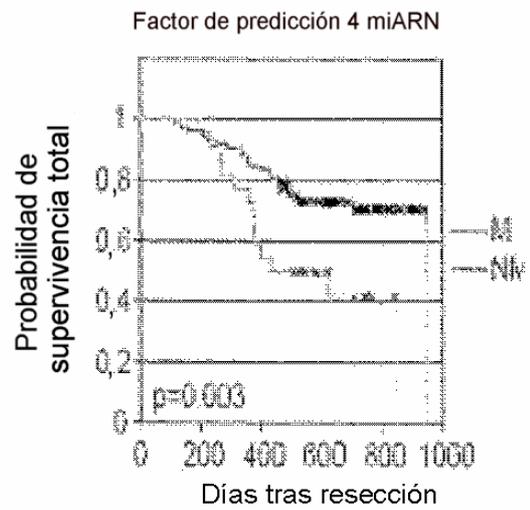


Fig. 3B

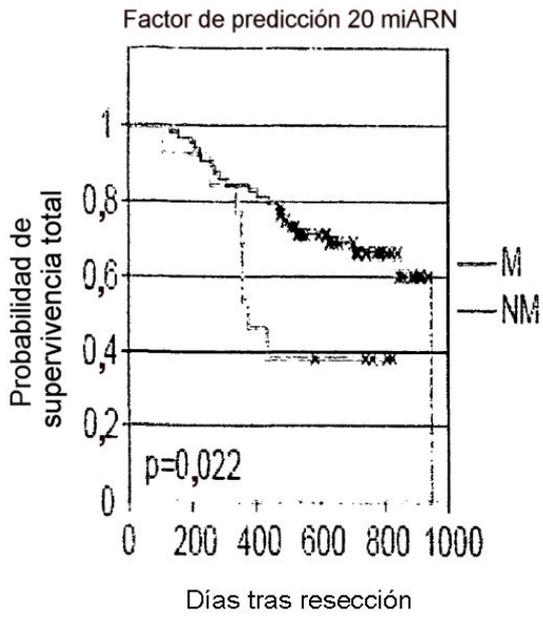


Fig. 3C

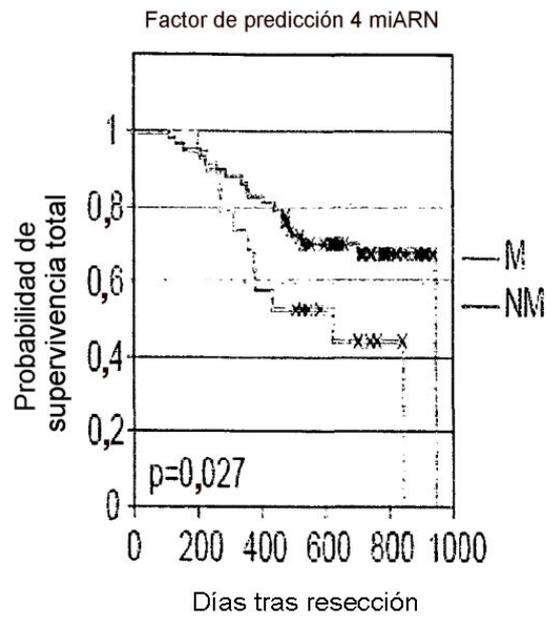


Fig. 3D

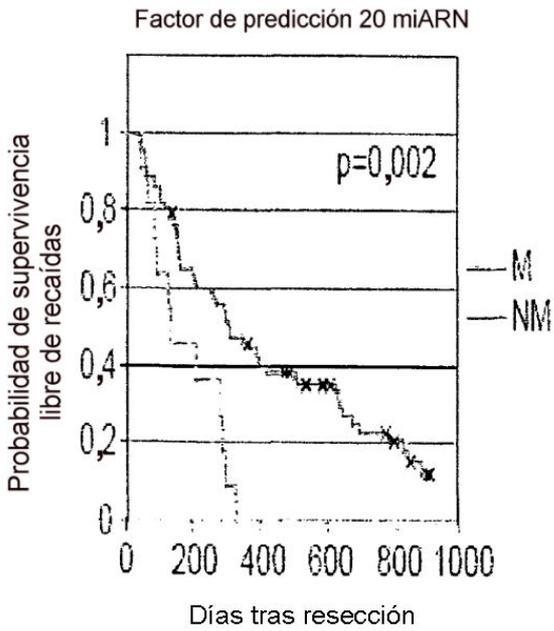


Fig. 3E

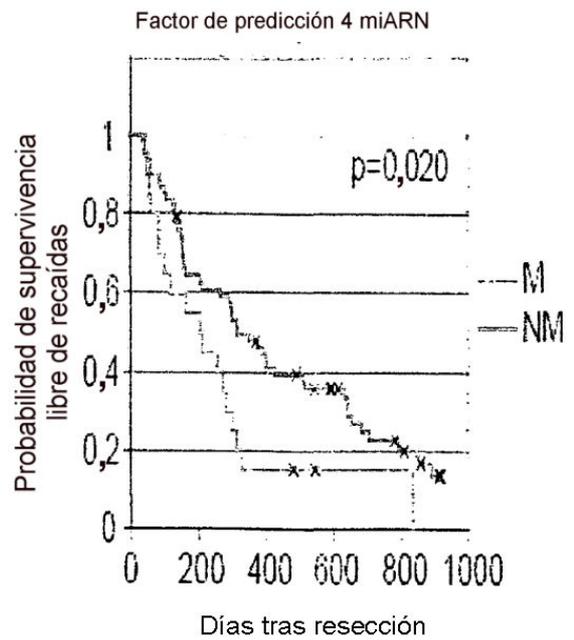


Fig. 3F

Variable clínica	Valor ^a
Masculino	213(87)
Edad al diagnóstico –años	
Media	50
Intervalo	13-83
Estado de Hepatitis vírica ^b	
CC	172(70)
AVR-CC	66(27)
sin datos	6(2)
Tamaño del tumor – cm	
≤3	88(36)
>3	156(64)
Multinodular:	
No	191(78)
Sí	53 (22)
Clase Child-Pugh	
A	233(96)
B	11(4)
Metástasis/recurrencia	
No	146(60)
Sí	93(40)
Estadificación TNM	
I	99(40)
II	90(37)
III	53(21)
IV	2(<1)

^a Cada valor representa: el número de pacientes (el % de pacientes)

^b CC: Portador crónico; AVR-CC: Portador crónico con replicación vírica activa

Fig. 4 - Tabla 1

Variable clínica	Valor ^a
Estadificación BCLC	
0	6(5)
A	74(67)
B	27(25)
C	3(3)
Estadificación CLIP	
0	45(41)
1	40(36)
2	25(23)
Estadificación OKUDA	
0	99(90)
1	11(10)
Estadificación TNM	
I	32(29)
II	56(51)
III	22(19)

^a Cada valor representa: el número de pacientes (el % de pacientes)

Fig. 7 – Tabla 4

Variable clínica	Supervivencia			Recurrencia		
	Análisis univariado ^a			Análisis multivariado ^b		
	Relación de riesgos (95% IC) ^c	Valor de p	Relación de riesgos (95% IC)	Valor de p	Relación de riesgos (95% IC)	Valor de p
Factor de predicción de miARN (M vs NM)^d	2,5 (1,1-5,8)	0,027	3,0 (1,2-7,8)	0,023	2,9 (1,5-5,7)	0,002
Edad (>50 años vs ≤50 años)	1,3 (0,6-2,8)	0,463	n.a. ^e		1,4 (0,8-2,3)	0,205
Sexo (M vs F)	1,8 (0,4-7,7)	0,415	n.a.		1,4 (0,6-3,3)	0,417
VHB (AVR-CC vs CC) ^f	1,1 (0,5-2,5)	0,726	n.a.		1,3 (0,8-2,2)	0,276
AFP (>20 ng/ml vs ≤20 ng/ml)	1,3 (0,6-2,9)	0,470	1,7 (0,7-3,8)	0,215	1,1 (0,6-1,8)	0,825
Cirrosis (Sí vs No)	1,0 (0,2-4,1)	0,961	1,3 (0,3-6,3)	0,704	1,4 (0,4-4,5)	0,558
ALT (≥50 U/l vs ≤50 U/l)	0,6 (0,3-1,4)	0,257	n.a.		1,3 (0,8-2,1)	0,296
Puntuación Child-Pugh (B vs A)	n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.d.
Tamaño del tumor (>3 cm vs ≤3 cm)	3,3 (1,4-7,7)	0,006	3,0 (1,2-7,4)	0,015	2,2 (1,3-3,6)	0,002
Encapsulación del tumor (Ninguna vs Completa)	1,1 (0,5-2,3)	0,864	n.a.		0,6 (0,3-1,0)	0,041
Multinodular (Sí vs No)	0,2 (0,1-0,7)	0,009	0,1 (0,0-0,5)	0,003	0,4 (0,2-0,7)	0,003
Invasión microvascular (Sí vs No)	1,7 (0,8-3,7)	0,146	0,7 (0,2-3,4)	0,698	1,1 (0,7-1,8)	0,683
Grado de Edmondson (III-IV vs I-II)	1,0 (0,5-2,1)	0,994	n.a.		1,2 (0,7-2,0)	0,542
Estadificación TMN (II vs I)	1,2 (0,6-2,7)	0,596	3,6 (0,7-18,6)	0,127	0,9 (0,5-1,4)	0,587
Estadificación CLIP (1 vs 0)	1,0 (0,5-2,2)	0,993	n.a.		1,0 (0,6-1,7)	0,920
Estadificación CLIP (2 vs 0)	0,5 (0,1-1,8)	0,304	n.a.		0,4 (0,2-1,0)	0,047
Estadificación BCLC (B+C vs 0+A)	0,7 (0,2-2,2)	0,508	n.a.		1,1 (0,5-2,1)	0,867

^a Análisis univariado: Regresión de riesgos proporcionales de Cox

^b Análisis multivariado: Regresión de riesgos proporcionales de Cox

^c 95% IC, 95% de Intervalo de Confianza

^d Factor de predicción de miR, Factor de predicción compuesto por 20 miR

^e CC portador crónico, AVR-CC, portador crónico con replicación vírica activa

^f n.a., no aplicable

Fig.5 - Tabla 2

Nº	miARN	Localización genómica	Valor de p paramétrico	% Apoyo CV	Intensidades medias en M	Intensidades medias en NM	Relación (M/NM)	Expresión en CHC metastásico	Dianas hospedadoras potenciales*	Tasa Estimada de falso descubrimiento (FDR)**
1	<u>mir-219-1</u> ^{***}	6p21.32	0,0002	100	578	391	1,48	Positiva	**PCDH17; **EPHA4	0,11; 0,14
2	<u>mir-207</u>	n.a.	0,0002	90	3676	2432	1,51	Positiva	n.a.	
3	<u>mir-338</u>	17q25.3	0,0001	90	356	250	1,42	Positiva	n.a.	
4	<u>mir-185</u>	22q11.21	0,0009	40	461	346	1,33	Positiva	n.a.	
5	<u>mir-30c-1</u>	1p34.2	0,0001	90	813	1618	0,50	Negativa	KIAA0063	0,13
6	<u>mir-124a-2</u>	8q12.3	0,0004	90	236	448	0,53	Negativa	G3BP2; GYS1; VAMP3	0,12; 0,14; 0,002
7	<u>mir-1-2</u>	18q11.2	0,0002	80	294	571	0,51	Negativa	G3BP2; GCLC	0,23; 0,15
8	<u>mir-19a</u>	13q31.3	0,0004	60	535	947	0,56	Negativa	n.a.	
9	<u>mir-34a</u>	1p36.2	0,0004	50	261	539	0,48	Negativa	SPTBN2	0,3
10	<u>mir-9-2</u>	5q14.3	0,0005	50	197	347	0,57	Negativa	RAB8A; SLC20A2; VAMP3	0,18; 0,071; 0,18
11	<u>mir-122a</u>	18q21.31	0,0005	50	466	781	0,60	Negativa	GYS1	0,12
12	<u>mir-148a</u>	7p15.2	0,0004	40	539	1084	0,50	Negativa	GTF2H1; PSCD3	0,27; 0,3
13	<u>mir-125b-2</u>	21q21.1	0,0007	40	1346	2337	0,58	Negativa	ITGA9; YES1	0,25; 0,2
14	<u>mir-15a</u>	13q14.2	0,0010	40	294	451	0,64	Negativa	ASPH; SLC20A2; SPTBN2	0,25; 0,036; 0,24
15	<u>mir-30e</u>	1p34.2	0,0010	40	960	1512	0,63	Negativa	n.a.	
16	<u>mir-148b</u>	12q13.13	0,0005	30	578	1063	0,54	Negativa	GTF2H1; PSCD3; **CSF1	0,27; 0,23; 0,24
17	<u>mir-194</u>	1q41	0,0008	30	406	689	0,59	Negativa	HBEGF	0,15
18	<u>mir-30a</u>	6q13	0,0008	30	2915	4572	0,64	Negativa	n.a.	
19	<u>mir-126</u>	9q34.3	0,0009	30	226	395	0,57	Negativa	n.a.	
20	Let-7g	3p21.2	0,0009	30	582	838	0,69	Negativa	PSCD3	0,14

* Genes diana hospedadores potenciales con el FDR están basados en TARGETSCAN. Estos genes son una parte de la firma del gen 153 de metástasis descrito en Ye y col., Nat Med., 9, 416-423, 2003, excepto los tres genes marcados con ** identificados recientemente, que están asociados con metástasis venosa de CHC (Budhu y col., Cancer Cell 2006, 10 (2) : 99-111).

*** Los factores de predicción de los 4 miARN consisten en miR-2198-1, miR-207, miR-30c-1 y miR-124a-2.

Fig. 6 – Tabla 3

Variable clínica	Supervivencia			Recurrencia		
	Análisis univariado ^a	Análisis multivariado ^b	Análisis univariado	Análisis multivariado	Relación de riesgos (95% IC)	Valor de p
Factor de predicción de miARN (M vs NM) ^c	Relación de riesgos (95% IC)	Valor de p	Relación de riesgos (95% IC)	Valor de p	Relación de riesgos (95% IC)	Valor de p
Edad (>50 años vs ≤50 años)	2,5 (1,1-6,2)	0,093	3,4 (1,3-9,0)	0,012	3,9 (1,4-6,4)	0,004
Sexo (M vs F)	1,5 (0,7-3,2)	0,330	n.a. ^d	n.a.	1,3 (0,7-2,2)	0,387
VHB (AVR-CC vs CC) ^e	1,4 (0,3-5,9)	0,653	n.a.	n.a.	1,5 (0,6-4,3)	0,398
AFP (>20 ng/ml vs ≤20 ng/ml)	1,4 (0,6-3,1)	0,393	n.a.	n.a.	1,3 (0,8-2,2)	0,356
Cirrosis (S vs No)	1,4 (0,6-3,2)	0,365	1,7 (0,8-3,9)	0,190	1,9 (0,6-1,7)	0,953
ALT (>50 U/l vs ≤50 U/l)	0,8 (0,2-3,4)	0,753	n.a.	n.a.	2,9 (0,5-8,4)	0,321
Puntuación Child-Pugh (B vs A)	0,9 (0,4-2,0)	0,818	n.a.	n.a.	1,3 (0,8-2,2)	0,324
Tamaño del tumor (>3 cm vs ≤3 cm)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Encapsulación del tumor (Ninguna vs Completa)	3,6 (1,5-8,5)	0,004	4,0 (1,5-10,2)	0,004	2,9 (1,6-4,9)	0,000
Multinodular (Sí vs No) ^f	1,1 (0,5-2,5)	0,750	n.a.	n.a.	0,5 (0,4-1,1)	0,118
Invasión microvascular (S vs No)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,3 (0,1-0,6)	0,001
Grado de Edmondson (III-IV vs I-III)	1,8 (0,8-4,0)	0,136	2,3 (0,3-19,2)	0,450	1,1 (0,7-1,9)	0,662
Estadificación TMN (II vs I)	1,0 (0,5-2,2)	0,938	n.a.	n.a.	1,1 (0,6-1,9)	0,786
Estadificación TMN (III vs I)	1,3 (0,6-2,9)	0,551	1,0 (0,1-10,0)	0,970	0,9 (0,5-1,5)	0,667
Estadificación CUP (1 vs 0)	1,0 (0,1-7,6)	0,974	0,4 (0,0-8,1)	0,555	n.a.	n.a.
Estadificación CLIP (2 vs 0)	1,0 (0,4-2,1)	0,925	n.a.	n.a.	1,9 (0,6-1,8)	0,988
Estadificación BCLC (A vs 0)	0,3 (0,0-2,4)	0,258	n.a.	n.a.	0,3 (0,0-1,0)	0,042
Estadificación OKUDA (1 vs 0)	2,2 (0,3-16,3)	0,438	n.a.	n.a.	1,4 (0,5-3,8)	0,550
	1,2 (0,4-3,6)	0,706	n.a.	n.a.	0,3 (0,3-2,1)	0,722

^a Análisis univariado: Regresión de riesgos proporcionales de Cox

^b Análisis multivariado: Regresión de riesgos proporcionales de Cox

^c 95% IC, 95% de Intervalo de Confianza

^d Factor de predicción de miARN: Factor de predicción compuesto por 20 miRN

^e CC: portador crónico, AVR-CC: portador crónico con replicación vírica activa

^f n.a., no aplicable

Fig.8 - Tabla 5

Variable clínica	Supervivencia				Recurrencia			
	Análisis univariado ^a		Análisis multivariado ^b		Análisis univariado		Análisis multivariado	
	Relación de riesgos (95% IC) ^c	Valor de p	Relación de riesgos (95% IC)	Valor de p	Relación de riesgos (95% IC)	Valor de p	Relación de riesgos (95% IC)	Valor de p
Factor de predicción de miARN (M vs NM)^d	2,7 (1,3-5,8)	0,009	3,3 (1,5-7,4)	0,003	1,9 (1,0-3,5)	0,057	2,3 (1,2-4,6)	0,013
Edad (>50 años vs <50 años)	1,3 (0,7-2,6)	0,452	n.a. ^e		1,4 (0,9-2,3)	0,122	n.a.	
Sexo (M vs F)	1,7 (0,4-7,0)	0,486	n.a.		1,2 (0,5-2,8)	0,672	n.a.	
VHB (AVR-CC vs CC) ^e	1,5 (0,7-3,0)	0,250	n.a.		1,3 (0,8-2,2)	0,234	n.a.	
AFP (>20 ng/ml vs ≤20 ng/ml)	1,3 (0,6-2,8)	0,478	n.a.		1,0 (0,6-1,7)	0,956	n.a.	
Cirrosis (Sí vs No)	1,3 (0,3-5,6)	0,669	n.a.		1,9 (0,6-6,0)	0,280	n.a.	
ALT (≥50 U/l vs <50 U/l)	0,8 (0,4-1,6)	0,503	n.a.		1,1 (0,7-1,8)	0,561	n.a.	
Puntuación Child-Pugh (B vs A)	n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.	
Tamaño del tumor (>3 cm vs ≤3 cm)	2,7 (1,2-6,2)	0,021	2,8 (1,2-6,7)	0,017	1,5 (0,9-2,4)	0,117	n.a.	
Encapsulación del tumor (Ninguna vs Completa)	1,2 (0,6-2,5)	0,648	n.a.		0,7 (0,4-1,2)	0,205	n.a.	
Multimodular (Sí vs No) ^f	0,3 (0,1-0,7)	0,006	0,2 (0,1-0,6)	0,002	0,3 (0,2-0,5)	<0,001	0,2 (0,1-0,4)	<0,001
Invasión microvascular (Sí vs No)	1,9 (0,9-3,9)	0,075	n.a.		1,1 (0,7-1,8)	0,562	n.a.	
Grado de Edmondson (III-IV vs I-II)	1,1 (0,5-2,1)	0,948	n.a.		1,2 (0,7-1,9)	0,564	n.a.	
Estadificación TMN (II vs I)	1,2 (0,6-2,7)	0,588	3,1 (1,3-7,2)	0,010	0,9 (0,5-1,4)	0,567	1,7 (1,0-3,1)	0,053
Estadificación TMN (III vs I)	0,7 (0,2-2,2)	0,519	1,6 (0,4-5,8)	0,506	0,3 (0,1-0,8)	0,010	0,6 (0,2-1,7)	0,309
Estadificación CLUP (1 vs 0)	1,0 (0,6-2,7)	0,602	n.a.		0,8 (0,5-1,3)	0,410	n.a.	
Estadificación CLUP (2 vs 0)	0,7 (0,2-2,3)	0,544	n.a.		0,4 (0,2-0,7)	0,006	n.a.	
Estadificación BCLC (A vs 0)	0,6 (0,2-1,4)	0,242	n.a.		0,5 (0,3-0,9)	0,028	2,2 (0,9-5,7)	0,097
Estadificación OKUDA (1 vs 0)	1,7 (0,7-4,1)	0,236	n.a.		1,3 (0,6-2,7)	0,506	2,0 (0,9-4,6)	0,085

^a Análisis univariado: Regresión de riesgos proporcionales de Cox

^b Análisis multivariado: Regresión de riesgos proporcionales de Cox

^c 95% IC, 95% de intervalo de confianza

^d Factor de predicción de miR: Factor de predicción compuesto por 20 miR

^e CC portador crónico, AVR-CC, portador crónico con replicación vírica activa

^f n.a., no aplicable

Fig.9 - Tabla 6

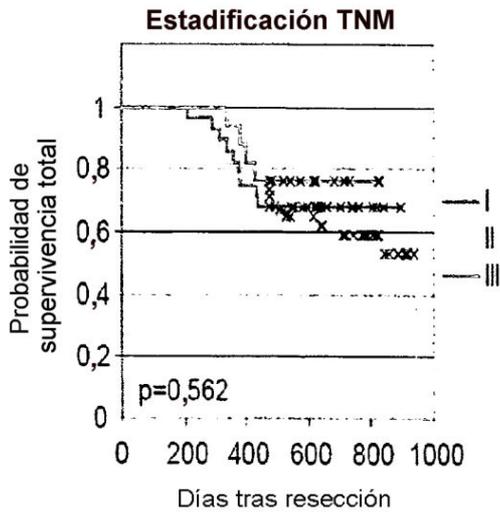


Fig. 10A

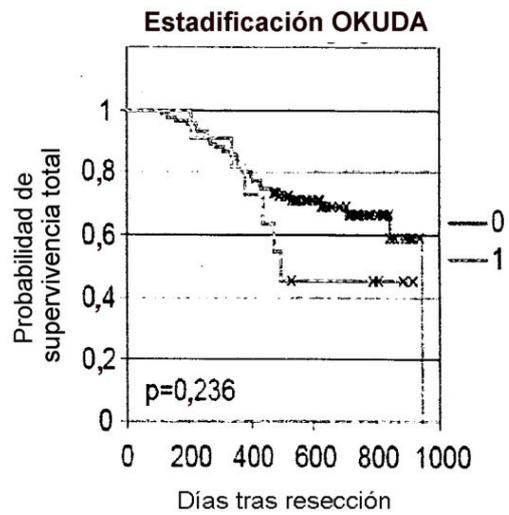
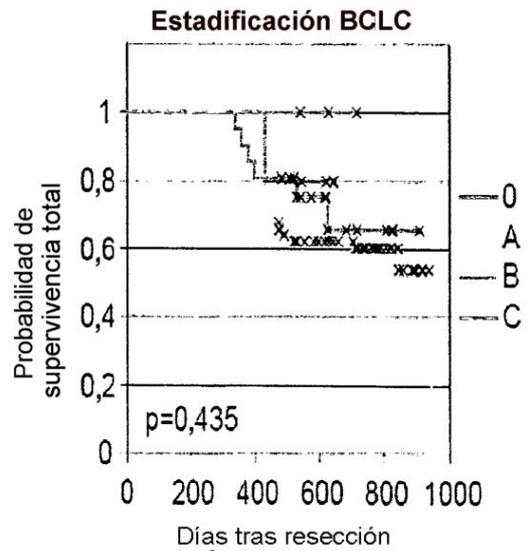
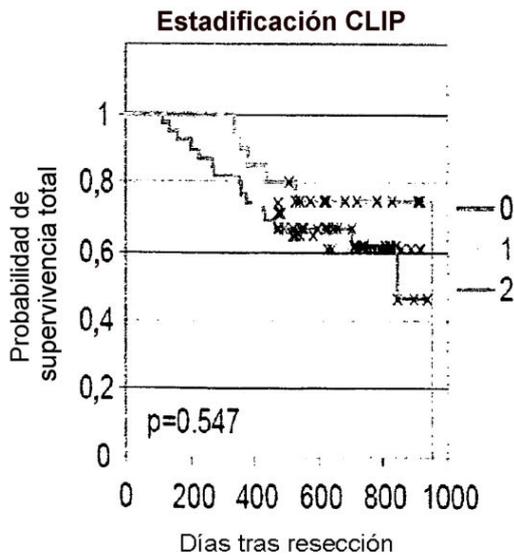


Fig. 10B



SEC. ID Nº	microARN	Secuencia (5'...3')
1	miR-126	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
2	miR-122	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
3	miR-148b	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU
4	miR-124a	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC
5	miR-194	UGUAAACAGCAACUCCAUGUGGA
6	miR-30c	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC
7	miR-30a	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
8	miR-148a	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
9	miR-30e	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG
10	miR-34a	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
11	Let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
12	miR-125b	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA
13	miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
14	miR-19a	UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA
15	miR-15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG
16	miR-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
17	miR-185	UGGAGAGAAAGGCAGUUCCUGA
18	miR-207	GCUUCUCCUGGCUCUCCUCCUC
19	miR-219-5p	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU
20	miR-219-3p	AGAGUUGAGUCUGGACGUCCCG
21	miR-338-5p	AACAAUAUCCUGGUGCUGAGUG
22	miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG

Fig. 11