

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 940**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2009 E 09763590 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2307028**

54 Título: **Uso de la familia miR-26 como marcador predictivo del carcinoma hepatocelular y sensibilidad a la terapia**

30 Prioridad:

11.06.2008 US 131800 P

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

13.12.2013

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (33.3%)
National Institutes Of Health Office Of Technology Transfer 6011 Executive Blvd. Suite 325
Bethesda, MD 20852-3804, US;
THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION (33.3%) y
FUDAN UNIVERSITY (33.3%)**

72 Inventor/es:

**WANG, XIN W.;
JI, JUNFANG;
CROCE, CARLO M.;
SUN, HUI-CHUAN y
TANG, ZHAO-YOU**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 433 940 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

Uso de la familia miR-26 como marcador predictivo del carcinoma hepatocelular y sensibilidad a la terapia

5 **Declaración sobre la investigación patrocinada a nivel federal**

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno con las subvenciones del Instituto Nacional del Cáncer N° Z01 BC 010313 y Z01 BC 010876. El gobierno tiene ciertos derechos en la presente invención.

10 **Campo técnico y aplicabilidad industrial de la invención**

La presente divulgación describe la identificación de miR-26 como marcador predictivo para el pronóstico de pacientes con CHC y la terapia adyuvante con interferón (IFN)- α .

15 **Antecedentes**

El carcinoma hepatocelular (CHC) es uno de los tumores malignos humanos más comunes en todo el mundo, con una incidencia creciente en Estados Unidos (Parkin *et al.*, *CA Cancer J. Clin.* 55 (2): 74-108, 2005). El CHC surge con más frecuencia en pacientes con inflamación de hígado como resultado bien de hepatitis viral causada por la infección con el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC), o de trastornos metabólicos o compuestos tóxicos. La hepatitis viral contribuye en más del 80 % de los casos de CHC del mundo (Thorgeirsson y Grisham, *Nat. Genet.* 31 (4): 339- 3465, 2002; Budhu y Wang, *J. Leukoc. Biol.* 80 (6) 20: 1197-1213, 2006). Una de las características clave del CHC es la disparidad entre géneros con una llamativa dominación masculina (es decir, es 2-6 veces más frecuente en varones que en mujeres) (El Serag y Rudolph, "Gastroenterology" 132 (7):2557-2576, 2007). Los experimentos de carcinogénesis *in vivo* clásicos también revelan una mayor susceptibilidad al CHC en los roedores macho (Ghebranious y Sell, "Hepatology" 27 (2): 383-391, 1998; Nakatani *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 92 (3): 249- 256, 2001; Rogers *et al.*, *Cancer Res.* 67 (24): 11536-11546, 2007; Naugler *et al.*, *Science* 317 (5834): 121-124, 2007). Por otra parte, las mujeres que padecen CHC tienden a tener una mayor supervivencia que los varones que lo padecen (Ng *et al.*, *Cancer* 75 (1): 18-22, 1995; Dohmen *et al.*, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18 (3): 267-272, 2003; Tangkijvanich *et al.*, *World J. Gastroenterol.* 10 (11): 1547- 1550, 2004). Estos resultados indican que la biología del tumor y el microambiente del huésped pueden diferir significativamente entre varones y mujeres.

Un estudio reciente sugiere que la disparidad entre géneros observada en el CHC se puede deber a una inducción de la interleucina-6 (IL-6) producida por células de Kupffer, que puede ser inhibida por estrógenos (Naugler *et al.*, *Science* 317 (5834): 121-124, 2007). De acuerdo con esta idea, otros estudios han revelado que los niveles séricos de IL-6 se elevan mucho en varias malignidades agresivas, incluyendo el CHC, y su expresión, que puede ser producida por las células tumorales, se asocia con enfermedades metastásicas y el mal pronóstico (Ashizawa *et al.*, *Gastric Cancer* 8 (2): 124-131, 2005; Porta *et al.*, *Ann. Oncol.* 19 (2): 353- 358, 2008). Estos estudios sugieren que las actividades procarcinogénicas de la IL-6 pueden estar reguladas por las hormonas sexuales, y los tumores con IL-6 activada pueden ser biológicamente distintos y más agresivos.

Hasta la fecha, la cirugía sigue siendo la única modalidad de tratamiento eficaz para el CHC que posibilita la curación. Sin embargo, solo aproximadamente el 10-20 % de los pacientes con CHC son actualmente aptos para una intervención quirúrgica. Además, los pacientes que reciben resecciones curativas a menudo tienen una alta frecuencia de recaída. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar herramientas de diagnóstico que proporcionen una resolución suficiente en la asistencia a la estratificación de los pacientes para el pronóstico y la terapia.

50 **Resumen de la divulgación**

Los microARN (miR) son pequeñas moléculas de ARN, de cadena simple, que regulan la expresión génica. En la presente memoria, se divulga que la expresión de microR-26 (miR-26) se reduce en el tejido tumoral del CHC con respecto al tejido no canceroso, y un bajo nivel de miR-26 se asocia con un mal resultado clínico. También se divulga en la presente memoria que hay una correlación entre el bajo nivel de expresión de miR-26 y una respuesta favorable a la terapia con interferón (IFN)- α en pacientes con CHC. Por lo tanto, en la presente memoria, se proporciona un método de predicción del resultado clínico de un paciente a quien se ha diagnosticado CHC que comprende detectar el nivel de expresión de miR-26 en una muestra de tumor de CHC obtenida del paciente, en el que una disminución en el nivel de expresión de miR-26 en la muestra de tumor en relación con un control predice una disminución de la supervivencia, una respuesta favorable a la terapia con IFN- α o ambas cosas.

También se proporciona un método de selección de un paciente a quien se ha diagnosticado CHC como candidato para la terapia de IFN- α , que comprende detectar el nivel de expresión de miR-26 en una muestra de tumor CHC obtenida del paciente, en el que la disminución en el nivel de expresión de miR-26 en la muestra de tumor en relación con un control indica que el paciente es un candidato para la terapia con IFN- α .

65

Se proporciona además un método de tratamiento de un paciente a quien se ha diagnosticado CHC, que comprende (i) detectar el nivel de expresión de miR-26 en una muestra tumoral obtenida del paciente; (ii) comparar el nivel de expresión de miR-26 de la muestra tumoral con el de un control; y (iii) seleccionar un método de tratamiento para el paciente, en el que el tratamiento comprende terapia de IFN- α solo si el paciente tiene una disminución de 1,5 veces o superior del nivel de expresión de miR-26 en la muestra tumoral en relación con el control.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el control es una muestra de tejido no canceroso obtenida del paciente. En otras realizaciones, el control es una muestra de hígado de un sujeto sano o un valor de referencia.

Se proporciona además un método de identificación de un agente terapéutico para el tratamiento del CHC que comprende detectar agentes candidatos *in vitro* para seleccionar un agente que aumente la expresión de miR-26 en células de CHC, identificando de este modo un agente para el tratamiento del CHC. En algunas realizaciones, la detección comprende poner en contacto los agentes candidatos con las células de CHC. Los agentes candidatos pueden ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, pero sin limitación, citocinas o moléculas pequeñas.

Las anteriores y otras características y ventajas de la divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones que se presenta con referencia a las figuras adjuntas.

20 Breve descripción de las figuras

El archivo de la patente o solicitud puede contener una o más figuras realizadas en color y/o una o más fotografías. Las copias de la presente publicación de patente o de la solicitud de patente con la/s figura/s a color y/o fotografía/s serán proporcionadas por la Oficina de Patentes previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

Figuras 1A -1D: expresión de miR-26 en tejidos y tumores hepáticos de varones y mujeres.

Figura 1A: los niveles de expresión de miR-26a-1 en tejidos hepáticos no cancerosos de mujeres (n = 30) y de varones (n = 194), determinados mediante el análisis de micromatrices. Se usó una prueba t de Student para muestras no relacionadas.

Figura 1B: los niveles relativos de expresión de miR-26a de casos de mujeres (n = 26) y casos G1 y G2 de varones de la misma edad (n = 56) se determinaron mediante qRT-PCR. Se usaron pruebas t de Student para muestras no relacionadas.

Figura 1C: las comparaciones de los niveles relativos de miR-26a-1 entre 224 tejidos NT y T relacionados cuando son dicotomizados por el estado de miR-26 en los tumores. Se usaron pruebas t de Student para muestras relacionadas: $p < 0,001$ del grupo de bajo nivel de miR-26-1; $p = 0,23$ del grupo de alto nivel de miR-26-1. Los datos de las **Figuras 1A-1C** se expresan como la expresión relativa al log 2 normalizada con respecto a una combinación de hígado normal libre de enfermedad (n = 8).

Figura 1D: niveles de expresión de miR-26a-1 en los tumores, determinados mediante el análisis de micromatrices, y los resultados de supervivencia. Se usó una prueba de rangos logarítmicos y el nivel de expresión medio como punto de corte. La baja expresión de miR-26 (n = 106) se clasificó como el percentil 50 inferior (con una reducción media de 2,69 veces en T en comparación con NT). La alta expresión de miR-26 (n = 111) se clasificó como el percentil 50 superior (con una reducción media de 0,98 veces en T en comparación con NT).

Figuras 2A-2C: actividades de transcripción distintas en HCC con bajo nivel de miR-26.

Figura 2A: gráfica de escalamiento multidimensional de 224 casos de CHC basada en la expresión de 11.580 genes. Las muestras están coloreadas basándose en la dicotomización media a la baja expresión de miR-26 (azul o claro) o alta expresión de miR-26 (rojo u oscuro).

Figura 2B: diagrama de Venn de los ARNm coexpresados en CHC de bajo nivel de miR-26.

Figura 2C: redes de genes de señalización DE NF κ B/IL-6 en CHC de bajo nivel de miR-26. Los genes sobrerregulados en los CHC de bajo nivel de miR-26 están resaltados en naranja o gris claro. Los genes impresos en gris no están en la lista de genes importantes, pero se presentan como relacionados con la red. Las líneas continuas y las líneas de puntos representan interacciones directas e indirectas, respectivamente, mientras que las flechas representan regulación positiva de (es decir, actúa sobre) la expresión génica. Los genes conectados por líneas solo representan unión. Las relaciones detalladas y las formas de la red se describen en la **Figura 15**.

Figuras 3A-3F: la asociación de la expresión de miR-26a en los tumores con pronóstico de supervivencia en dos ensayos de control aleatorios prospectivos con tratamiento de IFN (cohorte de ensayo de IFN, n = 118; cohorte de validación de IFN, n = 79).

Figuras 3A-3B: asociación de la expresión de miR-26a con la supervivencia global en pacientes con CHC de los

grupos de control (cohorte 2, **Figura 3A** del panel; cohorte 3, **Figura 3B** del panel). Cohorte 2: casos de alto nivel de miR-26a, n = 24; casos de bajo nivel de miR-26a, n = 35. Cohorte 3: casos de alto nivel de miR-26a, n = 21; casos de bajo nivel de miR-26a, n = 19.

5 **Figuras 3C-3D:** asociación de la terapia adyuvante de IFN con la supervivencia global en pacientes con CHC con baja expresión de miR-26a. Cohorte 2: casos de IFN, n = 24; casos de control, n = 35. Cohorte 3: casos de IFN, n = 20; casos de control, n = 19.

10 **Figuras 3E-3F:** asociación de la terapia adyuvante de IFN con la supervivencia global en pacientes con CHC con alta expresión de miR-26a. Cohorte 2: casos de IFN, n = 35; casos de control, n = 24. Cohorte 3: casos de IFN, n = 19; casos de control, n = 21.

Figura 4A: Tabla 1 - Características clínicas de los sujetos de la cohorte 1 y la cohorte 2.

15 **Figura 4B: Tabla complementaria 1** - Características clínicas de los sujetos para los ensayos de IFN - cohorte 2 y cohorte 3.

Figura 4CA: Tabla complementaria 2 - Características clínicas de los casos usados para buscar microARN relacionados con el género.

20 **Figura 5A: Tabla 2** - Análisis de regresión de Cox univariante y multivariante de los niveles de expresión de miR-26 y la supervivencia global en pacientes con CHC.

25 **Figura 5B: Tabla 3** - Análisis de regresión de Cox univariante y multivariante de la terapia con interferón y la supervivencia global al cáncer en sujetos con baja expresión de miR-26.

Figura 6A: Tabla complementaria 3 - Ocho microARN relacionados con el género.

Figura 6B: Tabla 3 – Lista de las 20 primeras redes de genes del análisis de vías INGENUITY™.

30 **Figuras 7A-7F:** la abundancia de la expresión de miR-26 en tejidos hepáticos de varones y mujeres, y en tumores de la cohorte de ensayo.

35 **Figura 7A:** los niveles de expresión de miR-26a-2 en mujeres (n = 30) y tejidos hepáticos no tumorales de varones (n = 194).

40 **Figura 7A:** comparaciones de los niveles relativos de miR-26a-2 entre T y NT relacionados cuando están dicotomizados por el estado de miR-26. Se usó un nivel de expresión medio como punto de corte. La baja expresión de miR-26 se clasificó como el percentil 50 inferior (con una reducción media de 2,69 veces en T en comparación con NT). La alta expresión de miR-26 se clasificó como el percentil 50 superior (con una reducción media de 0,98 veces en T en comparación con NT). Los datos en la **Figura 7A** y la **Figura 7B** se determinaron mediante análisis de micromatrices y se expresaron como el log 2 de la expresión relativa normalizada con respecto a una combinación de hígado normal libre de enfermedad (n = 8).

45 **Figura 7C:** niveles de expresión de miR-26a-2 en los tumores y los resultados de supervivencia.

Figuras 7D-7F: resultados similares a los de la **Figura 7A-7C** con el estado de la expresión de miR-26b.

50 **Figura 8:** estratificación de la muestra basándose en el estado de expresión de miR-26. Las muestras de CHC se clasificaron en función de su expresión de microARN media (es decir, miR-26a-1, 26a-2 y 26b). Se usó la expresión media para separar los casos en nivel bajo de miR-26 (azul o claro) y nivel alto de miR-26 (rojo u oscuro). La posición de cada punto (caso) se determina mediante tres niveles de expresión de microARN (miR-26a-1, miR-26a-2 y miR-26b). Los resultados de la estratificación se usaron para generar el gráfico MDS.

55 **Figuras 9A-9B:** expresión de *S100P* y *SLC2A6* en CHC y su correlación entre la micromatriz y qRT-PCR. Los niveles de expresión de *S100P* (**Figura 9A**) y *SLC2A6* (**Figura 9B**) en 10 CHC con bajo nivel de miR-26 y 10 casos de CHC con alto nivel de miR-26 determinados por qRT-PCR (panel izquierdo). Se muestra una regresión lineal y la correlación entre los datos de la qRT-PCR frente a la micromatriz con r (Spearman) y valor de p indicado (panel derecho). El estado de la expresión se muestra como la proporción de tejido tumoral (T)/no tumoral (NT).

60 **Figuras 10A-10C:** expresión de miR-26 y IL-6 en el CHC.

Figura 10A: niveles de expresión de IL-6 en 82 tumores (T) y tejidos no tumorales (NT) relacionados determinados mediante qRT-PCR. Se realizó la prueba t de Student para examinar la expresión diferencial de IL-6 entre T y NT.

65 **Figuras 10B-10C:** correlación de los niveles de expresión entre IL-6 y miR-26a (B **Figura 10B**) o miR-26b (**Figura**

10C) en 82 tumores y tejidos no tumorales relacionados determinados mediante qRT-PCR. Los datos se muestran como la proporción de T/NT en una escala log2.

Figura 11: la abundancia de la expresión de miR-26 en tejidos hepáticos de varones y mujeres, y en tumores de la cohorte de validación. La disminución de la expresión de miR-26a y miR-26b en los tumores (paneles de la derecha) con una expresión más abundante en los tejidos no tumorales de mujeres que en los de varones (paneles de la izquierda) es validada en una cohorte de validación independiente de un ensayo clínico aleatorizado retrospectivo. Los niveles de expresión de miR-26a y miR-26b se midieron mediante qRT-PCR. Los valores de p proceden de prueba t para muestras no relacionadas.

Figuras 12A-12F: la asociación de la expresión de miR-26b en los tumores con el pronóstico de supervivencia en dos ensayos de control aleatorizados prospectivos para el tratamiento adyuvante con IFN.

Figuras 12A-12B: la asociación de la expresión de miR-26b con la supervivencia global en casos de control de la cohorte 2 (**Figura 6A**) o de la cohorte 3 (**Figura 12B**). Cohorte 2: casos de alto nivel de miR-26b, n = 23; casos de bajo nivel de miR-26b, n = 36. Cohorte 3: casos de alto nivel de miR-26b, n = 21; casos de bajo nivel de miR-26b, n = 19.

Figuras 12C-12D: la asociación de la terapia adyuvante con IFN con la supervivencia global en pacientes con CHC con baja expresión de miR-26b. Cohorte 2: casos de IFN, n = 22; casos de control, n = 36. Cohorte 3: casos de IFN, n = 20, casos de control, n = 19.

Figuras 12E-12F: la asociación de la terapia adyuvante de IFN con la supervivencia global en pacientes con CHC con alta expresión de miR-26a. Cohorte 2: casos de IFN, n = 37; casos de control, n = 23. Cohorte 3: casos de IFN, n = 19; casos de control, n = 21.

Figura 13: Expresión de miR-26 en varios tipos de células incluyendo hepatocitos primarios recién aislados, línea celular inmortalizada de hepatocitos normales de hTERT HHT4, dos líneas celulares de CHC y CMSP de donantes sanos determinada por qRT-PCR.

Figura 14: expresión de *HGF* y CHC, y asociación con miR-26. Niveles de expresión de *HGF* en 10 HCC con bajo nivel de miR-26 y 10 casos de CHC con alto nivel de miR-26 determinados por qRT-PCR (panel izquierdo). Se muestra una regresión lineal y la correlación entre el nivel de *HGF* de qRT-PCR y los niveles de miR-26 de la micromatriz con r (Spearman) y valor de p indicado (panel derecho). El estado de la expresión se muestra como la proporción de tejido tumoral (T)/no tumoral (NT).

Figure 15: una descripción detallada de las relaciones y la formas de la red usadas en el análisis de vías.

Listado de secuencias

Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de una letra convencionales para las bases de nucleótidos, y el código de tres letras para los aminoácidos, como se define en 37 C.F.R 1.822. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada. En la lista de secuencias adjunta:

[SEC ID Nº 1] es la secuencia de nucleótidos de la forma precursora de miR-26a-1 humano = guggccucgu ucaaguaauc caggauagcg ugugcagguc ccaauaggcc uauucuggu.

[SEC ID Nº 2] es la secuencia de nucleótidos de la forma precursora de miR-26a-2 humano = ggcuguggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu gauuacuugu uucuggagcg agcu.

[SEC ID Nº 3] es la secuencia de nucleótidos de la forma precursora de miR-26b humano = ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua cuuggcucgg ggaccgg.

[SEC ID Nº 4] es la secuencia de nucleótidos de la forma madura de miR-26a-1 humano y miR-26a-2 = uucaaguaau ccaggauagc cu.

[SEC ID Nº 5] es la secuencia de nucleótidos de la forma madura de miR-26b humano = uucaaguaau ucaggauagc u.

Descripción detallada

Abreviaturas

1NN Vecino más próximo 1
3NN Vecino más próximo 3

	AFP	Fetoproteína alfa
	ALT	Alanina aminotransferasa
5	PCC	Indicador de la Covariable del Compuesto
	DLD	Diferenciador Lineal Diagonal
10	ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
	VHB	Virus de la Hepatitis B
	CHC	Carcinoma HepatoCelular
15	VHC	Virus de la Hepatitis C
	IFN	Interferón
20	IL	Interleucina
	ISH	Hibridación <i>In Situ</i>
	miR	MicroARN
25	miARN	MicroARN
	ARNm	ARN mensajero
30	NC	Centroide más cercano
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	pre-ARNip	microARN precursor
35	qRT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa
	ARN	Ácido RiboNucléico
40	ARNip	ARN Interferente Pequeño
	ARNnp	ARN Nuclear Pequeño
	SVM	Máquinas de Vectores de Soporte
45	TACE	Quimioembolización transarterial
	TNM	Tumor-nódulo-metástasis
50	<i>Términos</i>	

Se ha de entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son únicamente ilustrativas y explicativas, y no están destinadas a limitar el alcance de las enseñanzas actuales. En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se establezca específicamente lo contrario

El uso del artículo "un", "uno" y "una" cuando se usa en combinación con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria puede significar "uno/a", pero también coincide con el significado de "uno/a o más", "al menos uno/a" y "uno/a o más de uno/a".

Además, el uso de "comprenden", "contienen" e "incluyen", o las modificaciones de estas raíces, por ejemplo, pero sin limitación, "comprende", "contenido" y "que incluye", no pretende ser limitante. La expresión "y/o" significa que los términos anteriores y posteriores se pueden tomar juntos o por separado. A efectos 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 obtiene de secuencias genómicas o de un gen. A este respecto, el término "gen" se usa por simplicidad para referirse a la secuencia genómica que codifica el miARN precursor para un miARN dado. Sin embargo, las realizaciones de la invención pueden incluir secuencias genómicas de un miARN que participan en su expresión, tal como un promotor u otras secuencias reguladoras.

5 El término "miARN" se refiere, en general, a una molécula de una sola cadena, pero en realizaciones específicas, las moléculas implementadas en la invención también abarcarán una región o una cadena adicional que sea parcialmente (entre 10 y 50 % complementaria a lo largo de la cadena), sustancialmente (más del 50 % pero menos de 100 % complementaria a lo largo de la cadena) o totalmente complementaria a otra región de la misma molécula de cadena simple o de otro ácido nucleico. Por lo tanto, los ácidos nucleicos pueden abarcar una molécula que comprende una o más cadenas complementarias o auto-complementarias o "complemento/s" de una determinada secuencia que comprende una molécula. Por ejemplo, el miARN precursor puede tener una región auto-complementaria, que sea sondas de miARN hasta un 100 % complementarias de la invención que pueden ser o son al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 % complementarias a su diana

15 La expresión "combinaciones de los mismos", como se usa en la presente memoria, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden a la expresión. Por ejemplo, "A, B, C, o combinaciones de los mismos" se pretende que incluya al menos uno de entre: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un determinado contexto, también BA, CA, CB, ACB, ACB, ACB, BAC o CAB.

20 Los encabezamientos de apartado usados en la presente memoria son solo para fines de organización y no deben interpretarse, en modo alguno, como limitantes de la materia descrita. En el caso de que uno o más de entre la bibliografía y materiales similares defina o use un término o expresión de tal manera que contradiga la definición de ese término o expresión en la presente solicitud, prevalecerá la presente solicitud.

25 A menos que se indique lo contrario, las expresiones y los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Se pueden encontrar definiciones de las expresiones y los términos comunes en Biología molecular en Benjamin Lewin, "Genes" V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), "The Encyclopedia of Molecular Biology", publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), "Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference", publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1- 56081- 569- 8).

30 Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de expresiones y términos específicos:

35 **Terapia adyuvante:** un tratamiento usado en combinación con un tratamiento primario para mejorar los efectos del tratamiento primario. Por ejemplo, un paciente a quien se ha diagnosticado CHC se puede someter a una resección hepática como tratamiento primario y a terapia de interferón (IFN)- α como terapia adyuvante.

40 **Candidato:** como se usa la presente memoria, un "candidato" para la terapia de IFN- α es un paciente que se prevé que responda favorablemente a la terapia de IFN- α para el tratamiento del CHC.

45 **Resultado clínico:** se refiere al estado de salud de un paciente después de un tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como un CHC, o en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos incluyen, pero sin limitación, un aumento de la duración de tiempo hasta la muerte, una disminución en la duración de tiempo hasta la muerte, un aumento en la probabilidad de supervivencia, un aumento del riesgo de morir, supervivencia, supervivencia libre de enfermedad, enfermedad crónica, metástasis, enfermedad avanzada o agresiva, recurrencia de la enfermedad, muerte y respuesta favorable o desfavorable a la terapia.

50 **Control:** un "control" se refiere a una muestra o un valor de referencia usado para la comparación con una muestra experimental, tal como una muestra tumoral obtenida de un paciente con CHC. En algunas realizaciones, el control es una muestra de hígado obtenida de un paciente sano o una muestra de tejido no canceroso obtenida de un paciente a quien se ha diagnosticado CHC. En algunas realizaciones, el control es un control histórico o un valor de referencia (es decir, una muestra o grupo de muestras de control previamente analizada que representa los valores de referencia o normales, tales como el nivel de expresión de miR-26 en tejido no canceroso).

55 **Citocinas:** proteínas producidas por una amplia variedad de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas que afectan al comportamiento de otras células. Las citocinas son importantes para la respuesta inmune tanto innata como adaptativa.

60 **Disminución de la supervivencia:** como se usa en la presente memoria, "disminución de la supervivencia" se refiere a una disminución de la duración del tiempo antes de la muerte de un paciente, o un aumento del riesgo de morir para el paciente.

65 **Detección del nivel de expresión:** como se usa en la presente memoria, "detección del nivel de expresión de miR-26" se refiere a la cuantificación de la cantidad de miR-26 presente en una muestra. La detección de la expresión de

miR-26, o cualquier microARN, se puede realizar usando cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria tal como mediante qRT-PCR. La detección de la expresión de miR-26 incluye la detección de la expresión de bien una forma madura de miR-26 o una forma precursora que se correlaciona con la expresión de miR-26. En general, los métodos de detección de miARN implican la detección de la secuencia específica, tal como mediante RT-PCR. Se pueden diseñar cebadores y sondas específicos de miR-26 usando las secuencias de ácidos nucleicos de miR-26 precursor y maduro, que son conocidas en la técnica y se proporcionan en la presente memoria como SEC ID N°: 1-5.

Carcinoma HepatoCelular (CHC): el CHC es un tumor maligno primario del hígado que se produce normalmente en pacientes con inflamación de hígado como consecuencia de una hepatitis viral, toxinas hepáticas o cirrosis hepática (a menudo causada por el alcoholismo).

Interferón (IFN)- α : los interferones son un tipo de citocina producida por varios tipos diferentes de células, incluyendo los leucocitos (tales como linfocitos T, linfocitos B y células asesinas naturales) y fibroblastos. El interferón se induce como respuesta a la exposición a agentes foráneos tales como virus, parásitos y tumores. El ARN de doble cadena, a menudo indicativo de una infección viral, es un inductor común del interferón. Los interferones son importantes para la inhibición de la replicación viral, la activación de macrófagos y células asesinas naturales, y el aumento de la presentación de antígenos a los linfocitos. Los interferones incluyen IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Como se usa en la presente memoria, "terapia con IFN" o "terapia con IFN- α " para el CHC se refiere al tratamiento con IFN- α . Como se usa en la presente memoria, "una respuesta favorable a la terapia con IFN" o "una respuesta favorable a terapia con IFN- α " significa que un paciente tratado con IFN- α tiene un aumento de la supervivencia (un aumento de la duración del tiempo hasta la muerte o un aumento de la probabilidad de supervivencia), una mejora de los síntomas del CHC, una disminución de la propagación o metástasis del carcinoma hepatocelular, una disminución de la gravedad o la agresividad de la enfermedad, o cualquier otro parámetro clínico apropiado para la medición de una respuesta positiva a la terapia.

MicroARN (miARN, miR): moléculas de ARN de cadena simple que regulan la expresión génica. Los microARN tienen generalmente una longitud de 21-23 nucleótidos. Los microARN se procesan desde transcripciones primarias conocidas como pri-miARN de las estructuras de tallo-bucle corto denominadas (pre)-miARN precursor y, finalmente, microARN maduro, funcional. Las moléculas de microARN maduro son parcialmente complementarias a una o más moléculas de ARN mensajero, y su función principal consiste en infrarregular la expresión génica. Los MicroARN regulan la expresión génica a través de la vía de ARNi.

MicroARN-26: se refiere a una familia de microARN (también conocida como miR), que actualmente incluye miR-26a-1, miR-26a-2 y miR-26b. El término "microARN-26" incluye también los miembros aún no identificados de la familia microARN-26 que son expresados diferencialmente en los tumores de CHC con respecto a los tejidos sanos.

Expresión de miR-26: como se usa en la presente memoria, "una baja expresión de miR-26" y "alta expresión de miR-26" son expresiones relativas que se refieren al nivel de miR-26 encontrado en una muestra tal como una muestra de hígado sano o con CHC. En algunas realizaciones, la baja y la alta expresión de miR-26 se determinan mediante la comparación de los niveles de miR-26 de un grupo de muestras de hígado no cancerosas y con carcinoma hepatocelular. Luego se puede asignar la expresión baja y alta a cada muestra en función de si la expresión de miR-26 de una muestra está por encima de (alta) o por debajo (baja) del nivel de expresión de miR-26 medio. Para las muestras individuales, la alta o baja expresión de miR-26 se puede determinar mediante la comparación de la muestra con un control o muestra de referencia conocido por tener expresión alta o baja, o mediante la comparación con un valor de referencia. La baja y alta expresión de miR-26 puede incluir la expresión de la forma bien precursora o madura de miR-26, o ambas formas.

Paciente: como se usa en la presente memoria, el término "paciente" incluye animales humanos y no humanos. El paciente preferido para el tratamiento es un ser humano. "Paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en la presente memoria.

Vehículos farmacéuticamente aceptables: los vehículos farmacéuticamente aceptables (vehículos) útiles en la presente divulgación son convencionales. "Remington's Pharmaceutical Sciences", por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, XV Edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de uno o más compuestos terapéuticos, moléculas o agentes.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se esté empleando. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para las composiciones sólidas (por ejemplo, formas en polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas por administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de

tamponamiento del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

Prevención, tratamiento o mejoría de una enfermedad: la "prevención" de una enfermedad (tal como CHC) se refiere a la inhibición del pleno desarrollo de una enfermedad. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica una vez que ha comenzado a desarrollarse. "Mejorar" se refiere a la reducción del número o de la gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad.

Detección: como se usa en la presente memoria, "detección" se refiere al proceso usado para evaluar e identificar agentes candidatos que aumentan la expresión de miR-26. En algunos casos, la detección implica poner en contacto un agente candidato (tal como un anticuerpo, una molécula pequeña o una citocina) con células de CHC y probar el efecto del agente sobre la expresión de miR-26. La expresión de un microARN se puede cuantificar usando una cualquiera de una serie de técnicas conocidas en la materia y descritas en la presente memoria tales como mediante el análisis de micromatrices o mediante qRT-PCR.

Molécula pequeña: una molécula, generalmente, con un peso molecular de menos de aproximadamente 1.000 Daltons, o en algunas realizaciones, menos de aproximadamente 500 Daltons, en la que la molécula es capaz de modular, en cierta medida mensurable, una actividad de una molécula diana.

Terapéutico: un término genérico que incluye el diagnóstico y el tratamiento.

Agente terapéutico: un compuesto químico, una molécula pequeña u otra composición, tal como un compuesto antisentido, anticuerpo, inhibidor de proteasa, hormona, quimiocina o citocina, capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra correctamente a un sujeto. Por ejemplo, los agentes terapéuticos para el CHC incluyen agentes que previenen o inhiben el desarrollo o la metástasis del carcinoma hepatocelular. Como se usa en la presente memoria, un "agente candidato" es un compuesto seleccionado para la detección, para determinar si puede funcionar como un agente terapéutico para el CHC. En algunas realizaciones, el agente candidato se identifica como un agente terapéutico si el agente aumenta la expresión de miR-26 en células de CHC. "Incubar" incluye una cantidad suficiente de tiempo para que un agente interactúe con una célula o tejido. "Poner en contacto" incluye la incubación de un agente en forma sólida o en forma líquida con una célula o tejido. "Tratar" una célula o un tejido con un agente incluye poner en contacto o incubar el agente con la célula o el tejido.

Cantidad terapéuticamente eficaz: una cantidad de un agente farmacéutico o terapéutico especificado suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto, o en una célula, que se esté tratando con el agente. Por ejemplo, puede ser la cantidad de un agente terapéutico que aumente la expresión de miR-26 y/o la cantidad de un agente terapéutico que prevenga, trate o mejore el CHC en un paciente. La cantidad eficaz del agente dependerá de varios factores, incluyendo, pero sin limitación, el sujeto o las células que se están tratando, y la manera de administración de la composición terapéutica.

Tumor, neoplasia, malignidad o cáncer: el resultado de un crecimiento anormal y descontrolado de células. Neoplasia, malignidad, cáncer y tumor a menudo se usan indistintamente, y se refieren a un crecimiento anormal de un tejido o células que resulta de la división celular excesiva. La cantidad de un tumor en un individuo es la "carga tumoral", que se puede medir como el número, volumen o peso del tumor. Un tumor que no hace metástasis se denomina "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante y/o puede hacer metástasis se conoce como "maligno".

Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM): la clasificación TNM de los tumores malignos es un sistema de estadificación del cáncer para describir la extensión del cáncer en el cuerpo de un paciente. T describe el tamaño del tumor primario y si ha invadido el tejido cercano, N describe cualquiera de los ganglios linfáticos que están afectados y M describe la metástasis. La clasificación TNM es desarrollada y mantenida por la Unión Internacional contra el Cáncer para lograr un consenso sobre una norma reconocida a nivel mundial para clasificar el grado de propagación del cáncer. La clasificación TNM también es usada por el Comité Conjunto sobre el Cáncer y la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia de Estados Unidos.

A menos que se explique lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Los artículos en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto "que comprende A o B" significa que incluye A o B, o A y B. Además, se ha de entender que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan a modo descriptivo. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o el ensayo de la presente descripción, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria, incluyendo la descripción de los términos y de las expresiones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos, y no pretenden ser limitantes.

Perspectiva general de varias realizaciones

En la presente memoria, se divulga que la expresión de miR-26 se reduce en el tejido tumoral de CHC con respecto al tejido no canceroso, y un bajo nivel de miR-26 se asocia con un mal resultado clínico. También se divulga en la presente memoria que un bajo nivel de expresión de miR-26 se correlaciona con una respuesta favorable a la terapia con IFN- α de los pacientes con CHC.

Por lo tanto, en la presente memoria, se proporciona un método de predicción del resultado clínico de un paciente a quien se ha diagnosticado CHC, que comprende detectar el nivel de expresión de miR-26 en una muestra de tumor de CHC obtenida del paciente, en el que una disminución del nivel de expresión de miR-26 en la muestra de tumor en relación con un control predice una disminución de la supervivencia, una respuesta favorable a la terapia con IFN- α o ambas cosas. También se proporciona un método de selección de un paciente a quien se ha diagnosticado CHC como candidato para la terapia de IFN- α , que comprende detectar el nivel de expresión de miR-26 en una muestra de tumor de CHC obtenida del paciente, en el que una disminución del nivel de expresión de miR-26 en la muestra de tumor en relación con un control indica que el paciente es un candidato para la terapia con IFN- α .

En una realización de los métodos, el miR-26 es miR-26a-1. En otra realización, el miR-26 es miR-26a-2. En otra realización, el miR-26 es miR-26b. En otras realizaciones, miR-26 es una combinación de dos o más de entre miR-26a-1, miR-26a-2 y miR-26b.

En algunas realizaciones, el control es una muestra de tejido no canceroso obtenida del mismo paciente. En otras realizaciones, el control es una muestra de hígado obtenida de un sujeto sano tal como un donante de hígado sano. En otro ejemplo, el control es un valor de referencia calculado a partir de valores históricos. Las muestras tumorales y las muestras de tejidos no cancerosos se pueden obtener de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las muestras tumorales y no cancerosas se pueden obtener de pacientes con CHC que han sido sometidos a resección hepática, o se pueden obtener mediante extracción usando una aguja hipodérmica, por microdissección o por captura con láser. Las muestras de control (no cancerosas) se pueden obtener, por ejemplo, de un donante fallecido o de un donante de hígado sano.

La expresión de miR-26 de la muestra de tumor se disminuye (con respecto a un control) en una cantidad suficiente para conferir un efecto fenotípico tal como, por ejemplo, volver el tumor más susceptible al tratamiento mediante el IFN- α , modificar la velocidad de crecimiento del tumor, volver al tumor capaz de hacer metástasis. Si bien no se desea quedar ligados a la teoría, se cree que el efecto fenotípico está mediado por la expresión génica diferencial regulada por miR-26. El efecto fenotípico también puede ser un aumento o una disminución de la expresión de uno o más genes regulados por miR-26. En algunas realizaciones, la expresión de miR-26 de la muestra del tumor se disminuye al menos 1,1 veces, al menos 1,2 veces, al menos 1,3 veces o al menos 1,4 veces. En una realización, la expresión de miR-26 de la muestra de tumor se reduce al menos 1,5 veces en relación con el control. En otra realización, la expresión de miR-26 de la muestra de tumor se reduce al menos 2 veces en relación con el control. En otra realización, la expresión de miR-26 de la muestra de tumor se reduce al menos 2,5 veces en relación con el control. En otra realización, la expresión de miR-26 de la muestra de tumor se reduce por lo menos 3 veces en relación con el control. En otra realización, la expresión de miR-26 de la muestra de tumor se reduce al menos 3,5 veces en relación con el control. En otra realización, la expresión de miR-26 de la muestra de tumor se reduce al menos 4 veces en relación con el control. En otras realizaciones, la expresión de miR-26 de la muestra de tumor se reduce al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o al menos 10 veces. La expresión de miR-26 se puede detectar y cuantificar usando cualquier método conocido en la técnica tal como, pero sin limitación, micromatriz y qRT-PCR.

Se proporciona además un método de identificación de un agente terapéutico para el tratamiento del CHC que comprende agentes candidatos de detección *in vitro* para seleccionar un agente que aumente la expresión de miR-26 en células de CHC, identificando de este modo un agente para el tratamiento del CHC.

En algunas realizaciones, la detección comprende poner en contacto los agentes candidatos con las células de CHC. Las células de CHC pueden ser células primarias obtenidas de un paciente con CHC, o las células de CHC pueden ser células inmortalizadas o transformadas. En una realización, la expresión de miR-26 en las células de CHC se aumenta al menos 2 veces en relación con las células no tratadas. En otra realización, la expresión de miR-26 en las células de CHC se aumenta al menos 3 veces en relación con las células no tratadas. En otra realización, la expresión de miR-26 en las células de CHC se aumenta al menos 4 veces en relación con las células no tratadas.

Los agentes candidatos pueden ser cualquier tipo de agente, tal como una proteína, un péptido, una molécula pequeña, un anticuerpo o un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el agente candidato es una citocina. En algunas realizaciones, el agente candidato es una molécula pequeña. La detección incluye la detección de alto rendimiento y la detección individual o de pequeños grupos de agentes candidatos.

También se proporciona un método de tratamiento de un paciente a quien se ha diagnosticado CHC que comprende (i) detectar el nivel de expresión de miR-26 en una muestra tumoral obtenida del paciente; (ii) comparar el nivel de

expresión de miR-26 de la muestra tumoral con el de un control; y (iii) seleccionar un método de tratamiento para el paciente, en el que el tratamiento comprende terapia de IFN- α solo si el paciente tiene una disminución de 1,5 veces o superior del nivel de expresión de miR-26 en la muestra tumoral en relación con el control. En algunas realizaciones, el miR-26a es miR-26a-1, miR-26a-2, miR-26b o una combinación de los mismos.

5 En algunas realizaciones, el método de tratamiento comprende además la resección hepática. En algunas realizaciones, la terapia con IFN- α comprende la administración de IFN- α .

10 En una realización, el control es una muestra de tejido no canceroso obtenida del paciente. En otra realización, el control es una muestra de hígado de un sujeto sano. En otra realización, el control es un valor de referencia.

En algunas realizaciones del método, la expresión de miR-26 de la muestra del tumor se disminuye al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces o al menos 4 veces.

15 *Muestras de tejido tumoral*

Los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen la detección del nivel de expresión de miR-26 en muestras de tejido tumoral y no tumoral. En algunas realizaciones, las muestras de tejido se obtienen de sujetos a quienes se ha diagnosticado CHC y, en algunos casos, de sujetos sanos o de donantes fallecidos. Una "muestra" se refiere a parte de un tejido que bien es tejido entero, o una parte enferma o sana del tejido. Como se describe en la presente memoria, las muestras de tejido tumoral se comparan con un control. En algunas realizaciones, el control es muestra de tejido no canceroso obtenida del mismo sujeto tal como tejido hepático no canceroso que rodea el tumor de CHC. En otras realizaciones, el control es una muestra de hígado obtenida de un paciente sano o una muestra de tejido no canceroso de un cadáver. En otras realizaciones, la muestra de referencia es un valor de referencia basado en valores históricos.

Las muestras de tejido se pueden obtener de un sujeto usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las muestras de tejido se pueden obtener de pacientes con CHC que han sido sometidos a resección hepática como un tratamiento para el CHC. De estos pacientes, se pueden obtener tanto el tejido tumoral como el tejido circundante hepático no canceroso. En algunas realizaciones, la muestra de tejido no canceroso usado como control se obtiene de un cadáver. En otras realizaciones, la muestra de tejido no canceroso se obtiene de una donante de hígado sano (véase Kim *et al.*, "Hepatology" 39 (2): 518- 527, 2004).

En algunas realizaciones, las muestras de tejido se obtienen mediante biopsia. Las muestras de biopsia pueden ser recién extraídas, congeladas o fijadas, tales como fijadas con formalina y embebidas en parafina. Las muestras se pueden retirar de un paciente quirúrgicamente mediante extracción (por ejemplo, con aguja hipodérmica u otros tipos de agujas), mediante microdissección, mediante captura con láser o mediante cualquier otro medio conocido en la técnica.

40 *Métodos de detección de la expresión de miR-26*

Las secuencias de microARN precursores (pre-miARN) y miARN maduros son de dominio público, tal como a través de la base de datos miRBase, disponible en línea por el Instituto Sanger (véase Griffiths-Jones *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 36: D154-D158, 2008; Griffiths-Jones *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 34: D140-D144, 2006; y Griffiths-Jones, *Nucleic Acids Res.* 32: D109-D111, 2004). Las secuencias de las formas precursora y madura de los miembros de la familia miR-26 se proporcionan en la presente memoria como SEC ID N^o: 1-5. Aunque las formas precursoras de miR-26a-1 y miR-16a-2 son diferentes, las secuencias de las formas maduras de estos miR son idénticas (SEC ID N^o: 4).

La detección y la cuantificación de la expresión de microARN se puede realizar mediante uno cualquiera de una serie de métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N^o 2006/0211000 y 2007/0299030) y descritos a continuación. Con el uso de las secuencias conocidas de los miembros de la familia miR-26, se pueden diseñar sondas y cebadores específicos para su uso en los métodos de detección descritos a continuación según sea apropiado.

En algunos casos, el método de detección de miARN requiere el aislamiento de ácido nucleico de una muestra, tal como una célula o una muestra de tejido. Los ácidos nucleicos, incluyendo el ARN y, en concreto, miARN, se pueden aislar usando cualquier técnica adecuada conocida en la materia. Por ejemplo, la extracción basada en fenol es un método común para el aislamiento de ARN. Los reactivos basados en fenol contienen una combinación de desnaturizantes e inhibidores de RNasa para la rotura de células y tejidos, y la posterior separación del ARN de los contaminantes. Los procedimientos de aislamiento basados en fenol pueden recuperar especies de ARN en el intervalo de 10-200 nucleótidos (por ejemplo, miARN precursor y maduro, ARN ribosómico 5S y 5,8S (ARNr) y ARN nuclear pequeño (ARNnp)) U1. Además, los procedimientos de extracción tales como los que usan TRIZOL™ o TRI REAGENT™ purificarán todos los ARN, grandes y pequeños, y son métodos eficaces para el aislamiento del ARN total de las muestras biológicas que contienen miARN y ARN interferentes pequeños (ARNip).

65

Micromatriz

Una micromatriz es una matriz microscópica ordenada de ácidos nucleicos, proteínas, moléculas pequeñas, células u otras sustancias que permite el análisis paralelo de muestras bioquímicas complejas. Una micromatriz de ADN
5 consiste en diferentes sondas de ácidos nucleicos, conocidas como sondas de captura, que se unen químicamente a un sustrato sólido, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una perla del tamaño de una microesfera. Las micromatrices se pueden usar, por ejemplo, para medir los niveles de expresión de un gran número de moléculas de ARN mensajero (ARNm) y/o miARN simultáneamente.

10 Las micromatrices se pueden fabricar usando varias tecnologías, incluyendo la impresión con alfileres de punta fina en portaobjetos de vidrio, fotolitografía usando máscaras prefabricadas, fotolitografía usando dispositivos microespeculares dinámicos, impresión de chorro de tinta o electroquímica de matrices de microelectrodos.

15 El análisis con micromatrices de miARN se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquier método conocido en la materia (véase, por ejemplo, la publicación PCT N^o WO 2008/054828; Ye *et al.*, *Nat. Med.* 9 (4): 416-423, 2003; Calin *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 353 (17): 1793-1801, 2005). En un ejemplo, se extrae ARN de una muestra celular o tisular, se seleccionan según el tamaño ARN pequeños (ARN de 18-26 nucleótidos) del ARN total usando electroforesis sobre gel de poliacrilamida desnaturizante. Se unen enlazadores de oligonucleótidos a los extremos 5' y 3' de los ARN pequeños y los productos de la ligadura resultantes se usan como plantillas para una reacción de
20 RT-PCR con 10 ciclos de amplificación. El cebador PCR de cadena sentido tiene un fluoróforo unido a su extremo 5', marcando fluorescentemente de ese modo la cadena sentido del producto de PCR. El producto de PCR se desnaturaliza y luego se hibrida a la micromatriz. Un producto de PCR, al que se denomina ácido nucleico diana que es complementario a la secuencia de la correspondiente sonda de captura de miARN de la matriz se hibridará, a través de apareamiento de bases, con el punto en el que se fijan las sondas de captura. El punto entonces emitirá
25 fluorescencia cuando se excite mediante un escáner láser de micromatrices. Luego se evalúa la intensidad de la fluorescencia de cada punto, en términos del número de copias de un determinado miARN, usando una serie de controles positivos y negativos, y métodos de normalización de datos de matrices, lo que redundará en la evaluación del nivel de expresión de un miARN en particular.

30 En un método alternativo, el ARN total que contiene la fracción pequeña de ARN (incluyendo miARN) extraída de una muestra de células o tejido se usa directamente sin selección según el tamaño de pequeños ARN, y se marca en el extremo 3' usando ARN ligasa de T4 y ligador de ARN corto marcado fluorescentemente. Las muestras de ARN se marcan por incubación a 30 °C durante 2 horas, seguida de la inactivación por calor de la ARN ligasa de T4 a 80 °C durante 5 minutos. Los miARN marcados con fluoróforo complementarios a las correspondientes secuencias
35 de la sonda de captura de miARN en la matriz se hibridarán, mediante apareamiento de bases, en el punto en el que se fijan las sondas de captura. La exploración de micromatrices y el procesamiento de datos se llevan a cabo como se ha descrito anteriormente.

40 Se pueden emplear varios tipos de micromatrices, incluyendo las micromatrices de oligonucleótidos aplicados puntualmente, micromatrices de oligonucleótidos prefabricadas y matrices de oligonucleótidos largos aplicados puntualmente. En las micromatrices de oligonucleótidos aplicados puntualmente, las sondas de captura son oligonucleótidos complementarios a las secuencias de miARN. Este tipo de matriz se hibrida normalmente con productos de PCR amplificados de ARN pequeños seleccionados según el tamaño de dos muestras por comparar (tales como tejido no canceroso y tejido hepático de CHC) que están marcados con dos fluoróforos diferentes.
45 Como alternativa, el ARN total que contiene la fracción de ARN pequeño (incluyendo los miARN) se extrae de las dos muestras y se usa directamente sin selección por tamaño de ARN pequeños, y se marca en el extremo 3' usando ARN ligasa de T4 y enlazadores cortos de ARN marcados con dos fluoróforos diferentes. Las muestras se pueden mezclar e hibridar a una sola micromatriz que luego se explora, lo que permite la visualización de los genes de miARN suprarregulados e infrarregulados en un ensayo.

50 En micromatrices de oligonucleótidos prefabricadas o en micromatrices de una sola cadena, las sondas están diseñadas para adaptarse a las secuencias de miARN conocidas o predichas. Hay diseños disponibles en el mercado que cubren genomas completos (por ejemplo, de Affymetrix o Agilent). Estas micromatrices dan estimaciones del valor absoluto de la expresión génica y, por lo tanto, la comparación de dos condiciones requiere el
55 uso de dos micromatrices separadas.

Las micromatrices de oligonucleótidos largos aplicados puntualmente se componen de sondas de captura de oligonucleótidos 50 a 70-méricas, y se producen bien por impresión robótica o de chorro de tinta. Las micromatrices de oligonucleótidos cortas se componen de sondas de oligonucleótidos 20 a 25-méricas, y se producen por síntesis
60 fotolitográfica (Affymetrix) o mediante impresión robótica.

RT-PCR cuantitativa

65 La RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) es una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa usada para medir rápidamente la cantidad de un producto de la reacción en cadena de la polimerasa. La qRT-PCR se usa comúnmente con el propósito de determinar si una secuencia genética tal como un miR, está presente en una

muestra, y si está presente, el número de copias que hay en la muestra. Cualquier método de PCR que puede determinar la expresión de una molécula de ácido nucleico, incluyendo un miARN, pertenece al alcance de la presente descripción. Existen diversas variaciones del método de qRT-PCR conocido en la técnica, tres de las cuales se describen a continuación.

5 Los métodos para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa incluyen, pero sin limitación, a través de electroforesis en gel de agarosa, el uso de SYBR Green (un colorante de ADN de doble cadena) y el uso de una sonda fluorescente indicadora. Los dos últimos se pueden analizar en tiempo real.

10 Con electroforesis en gel de agarosa, se preparan la muestra desconocida y una muestra conocida con una concentración conocida de una sección con un tamaño similar de ADN diana para la amplificación. Ambas reacciones se realizan durante la misma cantidad de tiempo en condiciones idénticas (preferentemente, usando los mismos cebadores, o al menos cebadores de temperaturas de hibridación similares). La electroforesis en gel de agarosa se usa para separar los productos de la reacción de su ADN original y cebadores de repuesto. Las cantidades relativas de las muestras conocida y desconocida se miden para determinar la cantidad de la desconocida.

20 El uso del colorante SYBR Green es más preciso que el método de gel de agarosa, y puede dar resultados en tiempo real. Se une un colorante de unión a ADN a todo el ADN de doble cadena recién sintetizado, y se mide el aumento de la intensidad de la fluorescencia, permitiéndose así determinar las concentraciones iniciales. Sin embargo, SYBR Green marcará todo el ADN de doble cadena, incluyendo cualquiera de los productos de PCR inesperados, así como dímeros de cebadores, dando lugar a posibles complicaciones y aberraciones. La reacción se prepara como es habitual, con la adición de colorante fluorescente de ADN de doble cadena. Se efectúa la reacción, y se monitorizan los niveles de fluorescencia (el colorante solo emite fluorescencia cuando se une al ADN de doble cadena). Con referencia a una muestra de referencia o una curva de referencia, se puede determinar la concentración de ADN de doble cadena de la PCR.

30 El método de la sonda fluorescente indicadora usa una sonda basada en ácido nucleico específica de la secuencia para cuantificar solo la secuencia de la sonda y no todo el ADN de doble cadena. Se lleva a cabo habitualmente con sondas basadas en ADN con un indicador fluorescente y un interruptor mantenido en posiciones adyacentes (denominadas sondas doblemente marcadas). La proximidad del indicador al interruptor impide su fluorescencia, y solo se detecta la fluorescencia al descomponerse la sonda. Este proceso depende de la actividad exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa implicada.

35 La reacción de PCR cuantitativa en tiempo real se prepara con la adición de la sonda marcada doblemente. En la desnaturalización del molde de ADN de doble cadena, la sonda es capaz de unirse a su secuencia complementaria en la región de interés del molde de ADN. Cuando la mezcla de reacción de PCR se calienta para activar la polimerasa, la polimerasa comienza la síntesis de la cadena complementaria al molde de ADN monocatenario cebado. A medida que la polimerización continúa, se llega a la sonda unida a su secuencia complementaria, que luego se hidroliza debido a la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa, separando de este modo el indicador fluorescente y las moléculas interruptoras. Esto produce un aumento de la fluorescencia, que se detecta. Durante el ciclo térmico de la reacción de PCR en tiempo real, se monitoriza el aumento de la fluorescencia, liberado de la sonda doblemente marcada hidrolizada en cada ciclo de PCR, lo que permite la determinación exacta de las cantidades finales y, por tanto, iniciales de ADN.

45 *Hibridación in situ*

50 La hibridación *in situ* (ISH) aplica y extrapola la tecnología de hibridación de ácidos nucleicos a nivel de células individuales y, en combinación con la técnica de la citoquímica, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, permite el mantenimiento de la morfología y la identificación de marcadores celulares por mantener e identificar, y permite la localización de secuencias con respecto a las células específicas de poblaciones tales como tejidos y muestras de sangre. La ISH es un tipo de hibridación que usa un ácido nucleico complementario para localizar una o más secuencias específicas de ácido nucleico en una parte o sección de tejido (*in situ*) o, si el tejido es lo suficientemente pequeño, en todo el tejido (ISH del montaje entero). El ARN de la ISH se puede usar para analizar patrones de expresión de un tejido, tal como la expresión de miARN.

60 Las células o tejidos de muestra se tratan para aumentar su permeabilidad con el fin de permitir que una sonda, tal como una sonda específica del miARN, entre en las células. La sonda se añade a las células tratadas, se deja hibridar a la temperatura pertinente y se elimina mediante lavado el exceso de sonda. Una sonda complementaria se marca con un marcador radiactivo, fluorescente o antigénico, de modo que se pueden determinar la ubicación y la cantidad de la sonda en el tejido usando autorradiografía, microscopía de fluorescencia o inmunoensayo. La muestra puede ser cualquier muestra descrita en la presente memoria, tal como una muestra de hígado no canceroso o CHC. Dado que se conocen las secuencias de los miembros de la familia miR-26, se pueden diseñar sondas de miR-26 en consecuencia de manera que las sondas se unan específicamente a miR-26.

65

PCR in situ

La PCR *in situ* es la amplificación basada en PCR de las secuencias de ácidos nucleicos diana antes de la ISH. Para la detección de ARN, se introduce una etapa de transcripción inversa intracelular para generar ADN complementario a partir de moldes de ARN antes de la PCR *in situ*. Esto permite la detección de secuencias de ARN de baja copia.

Antes de la PCR *in situ*, se fijan y permeabilizan las células o muestras de tejido para preservar la morfología y permitir el acceso de los reactivos de PCR a las secuencias intracelulares que se van a amplificar. A continuación, se realiza la amplificación por PCR de secuencias diana bien en células intactas mantenidas en suspensión o directamente en preparaciones citocentrífugas o secciones de tejido en portaobjetos de vidrio. En el primer enfoque, las células fijadas en suspensión en la mezcla de reacción de PCR se ciclan térmicamente usando termocicladores convencionales. Después de la PCR, las células se citocentrifugan en portaobjetos de vidrio con la visualización de los productos de PCR intracelulares por ISH o inmunohistoquímica. La PCR *in situ* en portaobjetos de vidrio se lleva a cabo mediante la superposición de las muestras con la mezcla de PCR bajo un cubreobjetos, que después se cierra herméticamente para evitar la evaporación de la mezcla de reacción. El ciclado térmico se consigue colocando el portaobjetos de vidrio, bien directamente encima del bloque de calentamiento de un termociclador convencional o especialmente diseñado, o mediante el uso de hornos de ciclado térmico.

La detección de productos de PCR intracelulares se consigue generalmente mediante una de dos técnicas diferentes, PCR *in situ* indirecta por ISH con sondas específicas de productos de PCR, o PCR *in situ* directa sin ISH través de la detección directa de nucleótidos marcados (por ejemplo, digoxigenina-11-dUTP, fluoresceína-dUTP, 3H-CTP o biotina-16-dUTP), que se han incorporado en los productos de PCR durante el ciclado térmico.

Uso de miR-26 como marcador predictivo del pronóstico de CHC y para la identificación de agentes terapéuticos para el tratamiento de CHC

Se divulga en la presente memoria que miR-26 es un indicador independiente de pronóstico de supervivencia en pacientes con CHC. Las muestras de tumores de CHC con baja expresión de miR-26 en comparación con el tejido no canceroso del mismo sujeto o de un sujeto sano, predicen una disminución de la supervivencia. Además, cuando se estratificaron los resultados de la terapia del tratamiento con IFN- α de pacientes con CHC, solo los pacientes con baja expresión de miR-26 en tumores respondieron favorablemente a la terapia de IFN- α . Por lo tanto, el estado de miR-26 en los tumores se puede usar como una herramienta clínica en el pronóstico de los pacientes con CHC y para la selección de pacientes con CHC apropiados que puedan beneficiarse de la terapia adyuvante con IFN- α para prevenir la recaída. En algunos casos, la terapia con IFN- α se usa después de la resección hepática radical.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de miR-26 en una muestra de tumor CHC se compara directamente con el nivel de expresión de miR-26 en el tejido no canceroso circundante del mismo paciente. En otras realizaciones, la expresión de miR-26 en la muestra tumoral se compara con el nivel de expresión de miR-26 en una muestra de hígado obtenida de un sujeto sano, tal como un donante de hígado. En algunos casos, el tejido no canceroso usado como muestra de control se obtiene de un cadáver. En otras realizaciones, la expresión de miR-26 de la muestra tumoral se compara con un nivel de referencia basado en valores históricos. Por ejemplo, el valor de referencia se puede establecer basándose en los niveles medios de expresión de miR-26 en muestras de tejidos no cancerosos del hígado obtenidas de una cohorte de sujetos. Por ejemplo, la cohorte de sujetos puede ser un grupo de pacientes con CHC inscritos en un ensayo clínico. La cohorte de sujetos también puede ser un grupo de donantes fallecidos.

La baja expresión de uno o más miembros de la familia miR-26 en una muestra de tumor de CHC respecto a un control indica un mal pronóstico para el paciente e identifica al paciente como un buen candidato para la terapia adyuvante con IFN- α . Como se usa en la presente memoria, "mal pronóstico" se refiere, en general, a una disminución de la supervivencia, o en otras palabras, a un aumento del riesgo de morir o una disminución del tiempo hasta la muerte. El mal pronóstico también se puede referir a un aumento de la gravedad de la enfermedad, tal como un aumento de la propagación (metástasis) del cáncer a otros órganos. En una realización, la baja expresión de miR-26 se indica mediante al menos una disminución de 1,5 veces la expresión con respecto al control. En otras realizaciones, la baja expresión de miR-26 se indica mediante una disminución de al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 3,5 veces o al menos 4 veces en la expresión de miR-26 en relación con el control.

El hallazgo de que los pacientes con tumores de CHC que tienen mayores niveles de expresión de miR-26 tienen una mejor oportunidad de supervivencia indica que los compuestos que aumentan la expresión de miR-26 serán útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento del CHC. Por lo tanto, en la presente memoria, se proporciona un método para identificar agentes terapéuticos para el tratamiento del CHC que comprende detectar agentes candidatos *in vitro* para seleccionar un agente que aumente la expresión de miR-26 en células de CHC. En algunas realizaciones, la detección comprende poner en contacto los agentes candidatos con células de CHC y detectar cualquier cambio en el nivel de expresión de miR-26 en las células. Las células de CHC pueden ser células primarias obtenidas de un paciente con CHC, células inmortalizadas o transformadas obtenidas de un paciente, o las

células pueden ser líneas celulares inmortalizadas disponibles en el mercado tales como, pero sin limitación, células MHCC97, HepG2, Hep3B o SNU-423.

5 Un aumento de la expresión de miR-26 después del tratamiento con el agente candidato identifica al agente como un agente terapéutico para el tratamiento de CHC. Los métodos de detección de agentes candidatos para identificar agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad son bien conocidos en la técnica. Los métodos de detección de los niveles de expresión de miR-26 son conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria, tal como, pero sin limitación, el análisis de micromatrices, RT-PCR (incluyendo qRT-PCR), hibridación *in situ*, PCR *in situ* y análisis de transferencia Northern. En una realización, la detección comprende una detección de alto rendimiento. En otra realización, los agentes candidatos se detectan individualmente.

15 Los agentes candidatos pueden ser cualquier tipo de molécula tal como, pero sin limitación, moléculas de ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, anticuerpos, lípidos, moléculas pequeñas, productos químicos, citocinas, quimiocinas, hormonas o cualquier otro tipo de molécula que pueda alterar la expresión de miR-26 bien directa o indirectamente. En algunas realizaciones, los agentes candidatos son moléculas que participan en la vía de señalización de NFκB/IL-6. En otras realizaciones, los agentes candidatos son moléculas que participan en las redes de señalización de IL-10, STAT3 o factor inducible por interferón. En una realización, los agentes candidatos son citocinas. En otra realización, los agentes candidatos son moléculas pequeñas.

20 También se describe en la presente memoria un método para la caracterización del carcinoma hepatocelular (CHC), en el que se selecciona al menos una característica del CHC de una o más del grupo que consiste en: la presencia o ausencia de CHC; el diagnóstico de CHC; el pronóstico del CHC; la predicción de los resultados de la terapia; la monitorización de los resultados de la terapia; la idoneidad del CHC al tratamiento, tal como la idoneidad del CHC al tratamiento con quimioterapia y/o tratamiento de radioterapia; la idoneidad del CHC al tratamiento hormonal; la idoneidad del CHC a la eliminación por cirugía invasiva; la idoneidad del CHC a la terapia adyuvante combinada.

También se describe en la presente memoria un kit para la detección del CHC, kit que comprende al menos una sonda de detección que comprende uno o más miembros de la familia miR-26. El kit puede estar en forma de o comprender una matriz de oligonucleótidos.

30 También se describe en la presente memoria un método para la determinación de la idoneidad de un paciente con CHC para el tratamiento que comprende: i) aislar al menos una muestra de tejido de un paciente que padece CHC; ii) llevar a cabo la caracterización de al menos una muestra de tejido y/o utilizar una sonda de detección, para identificar al menos una característica del CHC; iii) basándose en al menos una característica identificada en la etapa ii), diagnosticar el estado fisiológico del paciente; iv) basándose en el diagnóstico obtenido en la etapa iii), determinar si el paciente se beneficiaría de tratamiento del CHC.

40 En ciertas realizaciones, la al menos una característica del cáncer se selecciona de entre una o más del grupo que consiste en: la presencia o ausencia del cáncer; el tipo de cáncer; el origen del cáncer; el diagnóstico del cáncer; el pronóstico del cáncer; la predicción de los resultados de la terapia; la monitorización de los resultados de la terapia; la idoneidad del cáncer al tratamiento, tal como la idoneidad del cáncer al tratamiento de quimioterapia y/o al tratamiento de radioterapia; la idoneidad del cáncer al tratamiento hormonal; la idoneidad del cáncer a la eliminación por cirugía invasiva; la idoneidad del cáncer a la terapia adyuvante combinada.

45 También se describe en la presente memoria un método para la determinación de la idoneidad de un cáncer para el tratamiento, en el que al menos una característica del cáncer es la idoneidad del cáncer al tratamiento, tal como la idoneidad del cáncer al tratamiento de quimioterapia y/o el tratamiento de radioterapia; la idoneidad del cáncer al tratamiento hormonal; la idoneidad del cáncer a la eliminación por cirugía invasiva; la idoneidad del cáncer a la terapia adyuvante combinada.

50 También se describe en la presente memoria un método para la determinación del pronóstico probable de un paciente de CHC que comprende: i) aislar al menos una muestra de tejido de un paciente que padece CHC; y ii) caracterizar al menos una muestra de tejido para identificar al menos una característica del CHC; en el que la característica permite la determinación del pronóstico probable del paciente de CHC.

55 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características particulares y/o realizaciones. Estos ejemplos no se deberían interpretar como limitantes de la divulgación a las características o realizaciones particulares descritas.

60 Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen el análisis de perfiles de microARN dependientes del género en CHC y su valor predictivo en el pronóstico de la supervivencia y los resultados terapéuticos. Para estos estudios, se analizaron dos cohortes independientes de 379 pacientes de CHC en total. La primera cohorte fue una cohorte de ensayo para identificar posibles microARN asociados con el CHC. La segunda cohorte (la cohorte de validación) se usó para confirmar los resultados obtenidos de la cohorte de ensayo. Con esta estrategia, se identificaron miembros de miR-

26 como microARN relacionados con el género, ya que se expresaron con mayor abundancia en los tejidos hepáticos de mujeres. Además, los niveles de expresión de los miembros de la familia miR-26 fueron significativamente infrarregulados en un subconjunto de muestras de tumores de CHC en comparación con sus tejidos no cancerosos relacionados independientemente del género. Los tumores con expresión reducida de miR-26
 5 tenían un perfil de expresión génica distinto, y los casos con baja expresión de miR-26 se asociaron con un mal pronóstico de supervivencia. Los datos descritos a continuación sugieren que miR-26 funciona como un supresor tumoral y los tumores con silenciamiento de miR-26 pueden ser biológicamente únicos.

10 **Ejemplo I: materiales, métodos y características de los pacientes**

10 **Muestras clínicas**

Se extrajeron muestras congeladas de forma instantánea o embebidas en parafina de tejidos hepáticos tanto tumorales (T) como de los tejidos circundantes no tumorales (NT) con el consentimiento informado de 455 pacientes con CHC que se sometieron a resección radical en el Instituto del Cáncer de Hígado de la Universidad de Fudan, Shanghai (376 casos) y en la Universidad del Centro Médico de Hong Kong, Hong Kong (79 casos), China (4). El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de los correspondientes institutos. Se obtuvo una combinación de muestras de tejido hepático normal de 8 donantes de hígado libres de enfermedad (24). Se usó una cohorte descrita anteriormente de 241 casos de CHC (cohorte 1: cohorte de ensayo), con datos de micromatrices de
 15 microARN disponibles (22), para buscar microARN asociados con el género y la supervivencia. Entre ellos, 17 carecían de datos de expresión de miR-26 y 9 carecían de datos de supervivencia, dejando 224 casos para los análisis de la expresión de miR-26 y 217 casos para los análisis de la supervivencia. Los casos de CHC (n = 135) de los ensayos de control aleatorizados (ECA) prospectivos (cohorte 2: cohorte de validación y cohorte de ensayo de IFN) (3) para evaluar la terapia adyuvante con IFN se usaron como una cohorte de validación independiente mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qR-PCR). Entre la cohorte 2,
 20 6 carecían de datos de expresión de miR-26 y 12 carecían de datos de supervivencia, dejando 129 casos (60 controles, 69 casos de IFN) para los análisis de la expresión de miR-26 y 118 casos (59 controles, 59 casos de IFN) para el análisis de supervivencia. Los 79 casos de CHC restantes (40 controles, 39 casos de IFN) de otro ECA prospectivo (cohorte 3: cohorte de validación de IFN) se usaron para validar la asociación entre el miR-26 y la terapia con interferón (4). En el anexo complementario, se describe detalladamente la metodología adicional.

25 **Características de los pacientes**

En el estudio, participaron dos cohortes independientes que consistían en 376 pacientes del Instituto del Cáncer de Hígado en Shanghai (**Tabla 1**) y una cohorte de validación de IFN adicional (**Figura 4 - Tabla complementaria 1**) de la Universidad de Hong Kong, todos con CHC histológicamente confirmado y una mayoría (90,5 %) de portadores crónicos de hepatitis B (VHB). La cohorte 1 consistió en 241 pacientes, mientras que la cohorte 2 consistió en 135 pacientes que participaron en un ECA prospectivo de la terapia con interferón (3). La cohorte 3 consistía en 79 pacientes con CHC de otro ECA prospectivo de terapia con interferón (4). Todos los pacientes recibieron resecciones hepáticas con intención curativa. La mayoría de los pacientes eran varones (85,1 %), con cirrosis (88,1 %), AFP sérica elevada (62,2 %) y una presentación solitaria (84,4 %). Las variables clínicas fueron similares entre las cohortes de ensayo y de validación, con la excepción del nivel en suero de la alanina transaminasa (ALT), la estadificación TNM y la terapia adyuvante. La actividad de la inflamación hepática en estos pacientes con CHC relacionados con el VHB, según lo indicado por los niveles de ALT, fue significativamente menor en los casos de la cohorte 2 que en la cohorte 1 o 3, y se encontraron más casos de CHC en etapa temprana en la cohorte 2. Además, 39 pacientes de la cohorte 1 recibieron terapias adyuvantes profilácticas, pero las respuestas parecieron mínimas (p = 0,9; prueba de rangos logarítmicos). Por el contrario, el 53,3 % de los pacientes de la cohorte 2 y el 49,4 % de la cohorte 3 recibieron una terapia adyuvante con IFN "con la intención de curar", lo que mejoró la supervivencia global (3, 4).
 45

50 **microARN relacionados con el género y resultados clínicos**

Para buscar microARN expresados de manera diferencial entre las muestras de hígado de varones y mujeres, se analizaron globalmente los perfiles de expresión de microARN de 241 casos de la cohorte 1, donde se disponía de datos de micromatrices de microARN tanto de tumores (T) como no tumorales (NT) (número de acceso GEO, GSE6857) (22). Para evitar posibles factores de confusión, se usó un conjunto de casos emparejados por edad y equilibrados para identificar microARN dependientes del género, que contenían todos los casos de mujeres (n = 30) y dos grupos de varones emparejados por edad, es decir, G1 (n = 31) y G2 (n = 31). Las características clínicas de los casos de mujeres y los casos de varones G1 o G2 fueron similares (**Figura 4 C - Tabla complementaria 2**).
 55

El análisis de comparación de clases reveló que 15 microARN (mujeres frente a varones G1) o 45 microARN (mujeres frente a varones G2) se expresaron diferencialmente en los tejidos NT, mientras que 7 se solaparon. Por el contrario, solo se encontró un microARN solapante, miR-129-2, en los tumores (**Figura 6A - Tabla complementaria 3**). Por lo tanto, hubo diferencias más consistentes en la expresión de microARN en microambientes hepáticos que en tumores.
 60
 65

Entre los microARN solapantes, se seleccionó miR-26a-1 para su posterior análisis, ya que su nivel fue el más significativamente diferente entre sexos y el más abundante. El análisis con los casos de la cohorte 1 mostró que el nivel de miR-26a-1 fue significativamente mayor en los hígados de mujeres que en los de varones (**Figura 1A**)

- 5 Este fue validado por la expresión de miR-26 maduro en los casos de mujeres (n = 26) y en los casos de varones de la misma edad (n = 56) mediante qRT-PCR (**Figura 1B**).

10 Entonces, los inventores de la presente memoria llegaron a la conclusión de que el miR-26 puede actuar como un gen supresor de tumores dependiente del género y, si es así, el silenciamiento de miR-26 sería un hecho frecuente en los tumores. Los análisis mostraron la observación de una reducción significativa de miR-26a-1 en T en comparación con muestras NT solo en los casos de bajo nivel de miR-26 ($p < 0,001$), pero no en los casos de alto nivel de miR-26 ($p = 0,23$) (**Figura 1C**) al dicotomizar 224 casos de CHC (bajo o alto nivel de miR-26 en función del nivel medio de miR-26a-1 en los tumores).

15 El factor de cambio medio (proporción de T/NT) fue de 0,37 en los casos de bajo nivel de miR-26a-1 y de 0,98 en los casos de alto nivel de miR-26a-1, lo que sugiere que el silenciamiento de miR-26 solo se asoció con casos de bajo nivel de miR-26. Por otra parte, los casos de bajo nivel de miR-26 se asocian con una baja supervivencia (**Figura 1D**).

20 En los seres humanos, hay tres miembros miR-26, es decir, miR-26a-1, miR-26a-2 y miR-26b. Estos microARN están muy conservados evolutivamente con 26A-1 y 26a-2, compartiendo una secuencia madura idéntica, lo que sugiere su redundancia funcional. Los patrones de expresión de los tres miembros miR-26 y sus asociaciones con la supervivencia fueron similares (**Figura 7**).

25 Los inventores de la presente memoria muestran ahora que los miembros miR-26 fueron expresados más abundantemente en el hígado de mujeres y que su silenciamiento puede ser importante en el desarrollo de un subconjunto de CHC con malos resultados.

Los patrones de expresión génica distintos se asocian con CHC de bajo nivel de miR-26

30 Para analizar si los CHC de bajo nivel de miR-26 pueden ser biológicamente diferentes, los inventores analizaron 224 casos de CHC emparejados con datos de microARN y micromatrices de ARNm disponibles. Los datos de micromatrices de ARNm se basaron en la expresión de ~21.000 genes de ARNm (número de acceso GEO, GSE5975) (27). El análisis de escalamiento multidimensional, basado en los tres primeros componentes principales de todos los genes, reveló que una mayoría de casos de bajo nivel de miR-26 se agrupó por separado de los casos de alto nivel de miR-26 (**Figura 2A**), de acuerdo con el estado de expresión dicotomizado de los tres miR-26 (**Figura 8**).

40 El análisis de comparación de clases mostró que la expresión de un número significativo de genes difirió en los tumores entre los grupos de alto y bajo nivel de miR-26, y hubo 915 genes en común (**Figura 2B**).

Se seleccionaron *SLC2A6* y *S100P* entre los genes expresados diferencialmente para la validación mediante qRT-PCR (**Figura 9**).

45 Además, un análisis de predicción de clases multivariante se tradujo en una predicción de las clases significativa de los casos de bajo nivel de miR-26 con una precisión global del 80,3 %. Por lo tanto, los casos de CHC de bajo nivel de miR-26 son distintos en sus patrones de expresión génica en comparación con los casos de CHC de alto nivel de miR-26.

50 Entre los 915 genes solapantes, 770 se sobreexpresaron en CHC de bajo nivel de miR-26. El análisis de red de genes usando estos 770 genes reveló una serie de posibles redes de tumorigénesis con una puntuación alta (> 10) (**Figura 6B - Tabla 4**).

55 El examen de los genes enriquecidos en diversas categorías reveló varias redes de señalización importantes, la más llamativa de las cuales mostró una activación predominante de la vía de señalización de NF κ B/IL-6 en los casos de bajo nivel de miR-26 (**Figura 2C**).

60 Se midió el nivel del gen diana NF κ B, IL-6, mediante qRT-PCR, ya que se relacionaba con el CHC y las desigualdades entre los géneros del CHC. La mayor parte de los casos de CHC con un nivel reducido de miR-26 tenían una elevación concomitante de la expresión de IL-6 (**Figura 10**). En conjunto, estos datos muestran que el CHC de bajo nivel de miR-26 tienen un perfil genético distinto.

Validación con cohortes independientes

65 Para validar la asociación de los miR-26 dependientes del género con la supervivencia, se detectaron miR-26 maduros mediante qRT-PCR en tejidos T y NT de la cohorte 2. Como la terapia adyuvante de IFN alteró los

resultados de supervivencia, se analizó el grupo de control. De acuerdo con la cohorte 1, la expresión de miR-26 era más abundante en los tejidos NT de mujeres, pero se observó una reducción significativa en los tumores, independientemente del género (**Figura 11**).

- 5 Además, la baja expresión de miR-26 en los tumores se asoció significativamente con la baja supervivencia de los pacientes (**Figura 3A, Figura 12A**).

Otra cohorte independiente (cohorte 3) mostró resultados compatibles (**Figura 3B, Figura 12B**).

- 10 Se usó el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox para evaluar mejor la asociación de la expresión de miR-26 con el pronóstico en los controles entre la cohorte 2 (**Tabla 2**).

- 15 En el análisis univariante, la baja expresión tumoral de miR-26a y la estadificación TNM se asociaron significativamente con el pronóstico. El modelo multivariante final mostró que la baja expresión de miR-26a en los tumores fue un indicador independiente de la baja supervivencia. Se encontró una tendencia similar para miR-26b. Por lo tanto, los valores de expresión de miR-26 dicotomizados fueron indicadores independientes del pronóstico.

Expresión de miR-26 y resultado terapéutico

- 20 El CHC de bajo nivel de miR-26 pareció ser biológicamente diferente, con un enriquecimiento de genes funcionalmente relacionados con la inmunobiología, incluyendo los de la vía de NFκB/IL-6. Si bien no se desea quedar vinculados a la teoría, los inventores de la presente memoria creen ahora que un tumor de este tipo puede ser “adictivo” en su respuesta a la actividad mediada por citocinas. Como la cohorte 2 consistió en los casos tratados con IFN, los inventores analizaron las asociaciones entre la expresión de miR-26 y el resultado terapéutico.

- 25 Los pacientes con baja expresión de miR-26a en los tumores tuvieron una supervivencia global significativamente mejor tras recibir terapia adyuvante de IFN en comparación con los del grupo de control ($p = 0,003$) (**Figura 3C**), lo que fue validado en la cohorte 3 (**Figura 3D**).

- 30 Por el contrario, los pacientes con alta expresión de miR-26a de ambas cohortes no respondieron al IFN (**Figuras 3E-3F**).

- 35 Se obtuvieron resultados similares con la expresión de miR-26b (**Figura 12C-12F**). Se usó el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox para evaluar el efecto del tratamiento en la supervivencia en grupos de bajo nivel de miR-26 de la cohorte 2 (**Figura 5 B - Tabla 3**).

- 40 En análisis tanto univariantes como multivariantes, el tratamiento con IFN se asoció con una mejora significativa de la supervivencia en el grupo de bajo nivel de miR-26. Un análisis de la interacción entre la expresión de miR-26, el tratamiento con IFN y la supervivencia también mostró que la expresión de miR-26 afecta significativamente a los resultados de supervivencia asociados con el IFN en estas dos cohortes (miR-26a, $p = 0,004$; miR-26b, $p = 0,02$). Por lo tanto, miR-26 es un indicador independiente de la respuesta al IFN.

Discusión

- 45 Este es el mayor estudio realizado hasta la fecha que analiza los perfiles de microARN dependientes de género en CHC relacionados con el VHB, y sus valores predictivos en el pronóstico de la supervivencia y los resultados terapéuticos usando tres cohortes independientes.

- 50 Los inventores de la presente memoria no han demostrado que los miR-26 se expresaran con mayor abundancia en los tejidos hepáticos de mujeres, pero su expresión fue significativamente infrarregulada en un subconjunto de CHC en comparación con sus tejidos no cancerosos relacionados, independientemente del género. Estos resultados indican que los miR-26 son microARN relacionados con el género y el tumor.

- 55 Además, los tumores con expresión reducida de miR-26 tuvieron un perfil de expresión génica distinto, y los casos con baja expresión de miR-26 tuvieron un mal pronóstico, pero respondieron favorablemente al tratamiento con IFN.

- 60 Estos resultados muestran que miR-26 puede ser un supresor tumoral. El silenciamiento de miR-26 en los hepatocitos puede contribuir al predominio masculino en el desarrollo de un CHC agresivo. Los siguientes resultados coinciden con la anterior hipótesis de los inventores: (1) miR-26 se expresa a niveles más altos en el hígado de mujeres, donde presumiblemente existen actividades más anti-cancerígenas; (2) la expresión de miR-26 está silenciada en un subconjunto de CHC con baja supervivencia; (3) los genes activados en CHC de bajo nivel de miR-26 están selectivamente enriquecidos en las vías de señalización de NFκB/IL-6; (4) miR-26 se expresa más abundantemente en hepatocitos y hepatocitos inmortalizados/no transformados que en células de CHC y PBMC (**Figura 13**).

65

Recientemente, se descubrió que la disparidad entre géneros del cáncer de hígado se debe a las diferencias de género en la inducción de IL-6 dependiente de MyD8 por NF- κ B en ratones (13). Curiosamente, los estrógenos inhiben la actividad promotora de IL-6, lo que puede contribuir a una disminución de la susceptibilidad al CHC en las mujeres.

5 Esto coincide con estos hallazgos, pues la expresión de IL-6 se correlacionó inversamente con miR-26. Por otra parte, muchos genes activados en los CHC de bajo nivel de miR-26 pueden funcionar en la inducción de la progesterona, pero inhiben la señalización de los estrógenos (redes de 5 y 15, **Figura 6B – Tabla complementaria 4**). Curiosamente, la expresión de miR-26 no se asoció con el factor de crecimiento hepático (HGF), otro factor importante en el CHC (**Figura 14**).

10 Los análisis de los inventores de la presente memoria revelaron que miR-26 fue un indicador independiente de la supervivencia. Sin embargo, cuando se estratificaron los resultados de la terapia de tratamiento con IFN, solo los pacientes con baja expresión de miR-26 en tumores respondieron favorablemente al tratamiento con IFN en dos ECA prospectivos independientes.

15 Estos resultados indican que el estado de miR-26 en los tumores es una herramienta clínica útil en el pronóstico de pacientes con CHC y en la asistencia a la selección de pacientes con CHC apropiados que se puedan beneficiar de la terapia adyuvante con IFN para prevenir una recaída.

20 En la actualidad, la mortalidad relacionada con la recaída es un problema clínico importante para los pacientes con CHC que reciben cirugía, y no hay un solo agente disponible como tratamiento convencional en un entorno adyuvante. De manera alentadora, Clavien evaluó los efectos adyuvantes del IFN tras la resección hepática o la ablación de tumores en 7 ECA, y llegó a la conclusión de que todos estos ensayos mostraron efectos beneficiosos modestos, pero que, claramente, se necesitaba una mejora (5). Además, entre los múltiples agentes experimentales, solo se observó un modesto beneficio en la supervivencia con el sorafenib (6). La baja eficacia de los agentes terapéuticos sistémicos actuales se puede deber a una incapacidad para seleccionar una subpoblación de pacientes que pueda responder más favorablemente a una determinada terapia del CHC.

25 Por primera vez, estos resultados proporcionan una solución a este problema. Los resultados descritos en la presente memoria han conducido ahora a redescubrir un agente de 'histórico', es decir, el IFN, cuyo modesto beneficio terapéutico tradicional se puede cambiar ahora, convirtiéndolo en un agente con un gran potencial.

30 Gracias a la solidez del indicador miR-26, el IFN se puede usar como tratamiento de primera línea para pacientes con CHC que reciban una resección y que tengan tumores con una expresión de miR-26 reducida, que se tendrán que evaluar en estudios prospectivos. Cabe señalar que los estudios presentados en la presente memoria fueron principalmente de pacientes chicos con CHC VHB positivo (~ 90 %) y, por lo tanto, es necesario evaluarlos en CHC no asiáticos y CHC derivados de otras enfermedades hepáticas subyacentes tales como la hepatitis C y/o el alcohol.

35 Aunque actualmente no está/n claro/s el/los mecanismo/s que hay tras la sensibilidad de los casos de CHC de bajo nivel de miR-26 hacia el tratamiento con IFN, los inventores de la presente memoria creen que estos CHC representan un único tipo de tumor con una activación específica de la vía de señalización sensible al IFN. Sistemáticamente, los CHC de bajo nivel de miR-26 fueron distintos de los CHC de alto nivel de miR-26 y tuvieron mal pronóstico de supervivencia. Muchos de los genes que se sobreexpresan en CHC de bajo nivel de miR-26 están relacionados con la inmunidad celular, tales como los que codifican citocinas pro- y anti-inflamatorias (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-10 e IL-17).

40 Por otra parte, muchas de las redes de señalización activadas en los CHC de bajo nivel de miR-26 están asociadas a nivel inmune tales como las redes de señalización de NF κ B/IL-6, IL-10, STAT3 y factores inducibles por IFN.

45 Una vez más, aunque no se desea quedar vinculados a la teoría, los inventores de la presente memoria creen que los tumores con baja expresión de miR-26 pueden tener una activación de la señalización de IFN única, potencialmente a través de la vía de señalización de NF κ B/IL-6, y por tanto, pueden ser sensibles a la inhibición del crecimiento mediada por el IFN a través de la señalización de IL-6/STAT3 (29).

50 Ahora se describe en la presente memoria la identificación de diferencias sistemáticas en los patrones de expresión de microARN entre los tejidos hepáticos de varones y mujeres obtenidos de pacientes con CHC. Los tumores con una reducción de la expresión de miR-26 fueron biológicamente diferentes, tenían peor pronóstico de supervivencia, pero respondieron favorablemente a la terapia adyuvante con IFN. Estos datos indican que miR-26 es un biomarcador de diagnóstico y de pronóstico útil para el CHC y que puede ayudar en la selección de pacientes que se puedan beneficiar significativamente de la terapia adyuvante con IFN.

Ejemplo II: Aislamiento de ARN y análisis de qRT-PCR en tiempo real

55 Se extrajeron ARN totales de tejidos congelados de la cohorte 1 usando los métodos de TRIZOL convencionales (Invitrogen, Carlsbad, CA) y de tejidos embebidos en parafina de la cohorte 2 y la cohorte 3 usando un kit de

purificación de ARN MasterPure (Epicentro, Madison, WI). Se midió la expresión de microARN maduros usando ensayos de microARN Taqman específicos de miR-26a y miR-26b después de la transcripción inversa (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas las comparaciones entre estratos (género, miR etc.) se realizaron dentro de cada cohorte. Se usó el ensayo de microARN Taqman para ARN de U6 para normalizar la abundancia relativa de los microARN. La expresión de IL-6 se midió usando el ensayo de genes TaqMan específico de este gen después de la transcripción inversa mediante el uso del kit de archivo de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se usó el ensayo de genes Taqman para 18s para normalizar la abundancia relativa de ARNm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

10 **Análisis de micromatrices y estadísticas**

Para los perfiles de micromatrices de microARN, se perfilaron por separado los tumores y los tejidos no tumorales relacionados usando una plataforma matricial de un solo canal descrita anteriormente (22). El control de calidad, el preprocesamiento y la normalización de los datos de las matrices se realizaron esencialmente como se ha descrito previamente (22). Se usó el programa informático BRB-ArrayTools 3.6.0 (<http://linus.nci.nih.gov>) para los análisis de micromatrices como se ha descrito previamente (25, 26). Las sondas de microARN con ausencia de valores en más del 50 % de las matrices y las que tenían menos del 20 % de los valores de los datos de expresión con al menos un cambio de 1,5 veces en cualquier dirección con respecto al valor medio de la sonda se excluyeron del análisis, lo que dejó 624 sondas. Se usó un análisis comparativo de clases usando las estadísticas de t para identificar microARN que fueron expresados diferencialmente en los tumores o los tejidos circundantes no cancerosos entre varones y mujeres.

Para este análisis, el umbral de significación inicial de los ensayos univariantes se fijó en $p < 0,05$ y los análisis se basaron en 1.000 permutaciones para el ensayo multivariante para generar valores de p de permutación para el ensayo global con el fin de controlar las tasas de falso descubrimiento. Para los perfiles de las micromatrices de expresión de ARNm, los inventores usaron su propio conjunto de datos de oligomatrices previamente disponible basándose en una plataforma de doble canal (es decir, proporción de T/NT) (27) que contenía 224 casos coincidentes con aquellos con los datos de micromatrices de microARN disponibles descritos anteriormente. Los inventores usaron la expresión media en los tumores para dicotomizar los casos de CHC, en los que la baja expresión de miR-26 se clasificó como el percentil 50 inferior y la alta expresión de miR-26 se clasificó como el percentil 50 superior. Se usó el análisis de comparación de clases basado en niveles de expresión de miR-26 dicotomizados para identificar ARNm expresados diferencialmente entre CHC de bajo nivel de miR-26 y alto nivel de miR-26. Los mismos criterios de filtrado de sondas se siguieron como se ha descrito anteriormente, dejando 11.580 sondas de expresión para estas comparaciones

También se usaron seis algoritmos de predicción de clase, es decir, Máquinas de Vectores de soporte (SVM), Predictor de la Covariable del Compuesto (PCC), Discriminante Lineal Diagonal (DLD), Vecino más cercano 1 (1NN), vecino más cercano 3 (3NN) o centroide más cercano (NC) para determinar si los patrones de expresión de ARNm podían diferenciar con precisión los CHC de bajo nivel de miR-26 de los CHC de alto nivel de miR-26. En estos análisis, se eligieron al azar el 90 % de las muestras para construir un clasificador que después se usaría para predecir el 10 % restante de los casos. Se calculó la exactitud de la predicción después de 1.000 repeticiones de este proceso de partición aleatoria para controlar el número y la proporción de los falsos descubrimientos. Se realizó un análisis de agrupación jerárquica usando BRBArrayTools con la correlación centrada en la mediana y la vinculación completa. Con el uso de un enfoque no supervisado, también se realizaron análisis de escalamiento multidimensional usando todas las muestras de la cohorte 1 basándose en los tres primeros componentes principales de 11.580 genes que pasaron por el filtro. Los niveles de expresión de estos genes se transformaron logarítmicamente, y se usó la distancia euclidiana para determinar sus posiciones. Los análisis de la red de genes se usaron para identificar vías de señalización que estaban enriquecidas con los genes expresados diferencialmente en los tumores entre CHC de bajo nivel de miR-26 y de alto nivel de miR-26, usando el Análisis de Vías Ingenuity (Ingenuity®, www.ingenuity.com).

Se usó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para comparar la supervivencia de los pacientes basándose en la expresión de miR-26 dicotomizada, usando el programa informático GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA), con los valores de p estadísticos generados mediante la prueba de rangos logarítmicos de Mantel-Cox. Se usaron análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox para analizar el efecto de las variables clínicas en la supervivencia del paciente con el uso de STATA 9.2 (College Station, TX). Se usó un ensayo univariante para examinar la influencia de cada variable clínica en la supervivencia. Se realizó un análisis multivariante teniendo en cuenta las variables clínicas del análisis univariante que se asociaron significativamente con la supervivencia con el conjunto de significación de $p < 0,05$. Se evaluó la multi-colinealidad de las covariables y no se encontró presente. En los modelos finales, se incluyó el género como covariable, debido a su importancia biológica en el resultado de los CHC y su asociación con la expresión de miR-26. Se determinó que los modelos finales cumplieron el supuesto de riesgos proporcionales. Para los datos de RT-PCR, el valor estadístico de P, generado mediante la prueba t de Student, y la constante de correlación de Spearman se calcularon usando el programa informático GraphPad Prism 5.0. La significación estadística se definió como $p < 0,05$. Todos los valores de p de la presente memoria son dobles.

Ejemplo III: Método de tratamiento del CHC en pacientes que muestran una baja expresión de miR-26 en muestras de tumores de CHC

En este ejemplo, se describe un método de selección y tratamiento de pacientes con CHC que tienen probabilidad de tener una respuesta favorable al tratamiento con IFN- α como terapia adyuvante.

Para algunos pacientes con CHC, las terapias adyuvantes tales como la terapia con IFN- α pueden prolongar la supervivencia (Sun *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132 (7):458-465, 2006). Sin embargo, sería beneficioso identificar a los pacientes que tienen más probabilidades de beneficiarse de la terapia adyuvante con IFN- α antes de iniciar el tratamiento.

Ahora se divulga en la presente memoria que el pronóstico de los pacientes con CHC que expresan niveles bajos de miR-26 en muestras de tumores de CHC en relación con un control (tal como tejido hepático no canceroso obtenido del mismo paciente) mejoran significativamente después del tratamiento con IFN- α . Por el contrario, los pacientes que expresan niveles altos de miR-26 en muestras de tumores, no presentan un aumento significativo de la supervivencia tras el tratamiento con IFN- α y, por lo tanto, no son buenos candidatos para dicho tratamiento adyuvante.

En primer lugar, se somete el paciente a quien se ha diagnosticado CHC a una resección hepática con la intención curarle. Se extraen muestras de tumor de CHC y de tejido no canceroso de la parte del tejido hepático extraído del paciente. Luego se aísla ARN de las muestras de tejido usando cualquier método apropiado para la extracción de ARN pequeños que sea bien conocido en la técnica, tal como mediante el uso de TRIZOLTM. A continuación, se somete el ARN purificado a RT-PCR usando cebadores específicos de miR-26 con el fin de determinar el nivel de expresión de miR-26 en los tejidos tumorales y no cancerosos. Si la expresión de miR-26 es al menos 1,5 veces menor en el tejido tumoral que en el tejido no canceroso, el paciente es un candidato para la terapia adyuvante con IFN- α .

Por consiguiente, se trata el paciente con una cantidad terapéuticamente eficaz de IFN- α de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sun *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132 (7): 458- 465, 2006; Qian *et al.*, *Cancer* 107 (7): 1562- 1569, 2006). La dosis y la pauta de dosificación de IFN- α variarán dependiendo de varios factores, tales como el estado de salud del paciente y la fase del CHC. En general, el IFN- α se administra 1-3 veces a la semana durante un máximo de aproximadamente seis meses.

Ejemplo IV: Método de tratamiento alternativo para los pacientes con CHC con baja expresión de miR-26

En este ejemplo, se describe un método de tratamiento de un paciente a quien se ha diagnosticado CHC y que muestra una baja expresión de miR-26 con la terapia de interferón en ausencia de resección hepática. Para determinar si un paciente a quien se ha diagnosticado CHC es un buen candidato para la terapia con IFN- α , se extrae una muestra de tumor de CHC del paciente que no ha sido sometido a resección hepática, junto con una muestra de tejido hepático no canceroso. Las muestras de tejido se pueden obtener de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las muestras de tejido se pueden obtener mediante la realización de un procedimiento de biopsia usando una aguja hipodérmica para retirar los tejidos deseados.

Luego se aísla el ARN de las muestras de tejido usando cualquier método apropiado para la extracción de ARN pequeños que sea bien conocido en la técnica, tal como mediante el uso de TRIZOLTM. A continuación, se somete el ARN purificado a RT-PCR usando cebadores específicos de miR-26 con el fin de determinar el nivel de expresión de miR-26 en los tejidos tumorales y no cancerosos. Si la expresión de miR-26 es al menos 1,5 veces menor en el tejido tumoral que en el tejido no canceroso, el paciente es un candidato para la terapia adyuvante con IFN- α .

Por consiguiente, se trata el paciente con una cantidad terapéuticamente eficaz de IFN- α de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sun *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132 (7): 458- 465, 2006; Qian *et al.*, *Cancer* 107 (7): 1562- 1569, 2006). La dosis y la pauta de dosificación de IFN- α variarán dependiendo de varios factores, tales como el estado de salud del paciente y la fase del CHC. En general, el IFN- α se administra 1-3 veces a la semana durante un máximo de aproximadamente seis meses.

Ejemplo V: Método de tratamiento de CHC en pacientes que muestran una alta expresión de miR-26 en muestras de tumores de CHC

El presente ejemplo describe un método de tratamiento de un paciente a quien se ha diagnosticado CHC que presenta un alto nivel de expresión de miR-26 en el tumor de CHC.

En primer lugar, se somete el paciente a quien se ha diagnosticado CHC a una resección hepática con la intención curarle. Se extraen muestras de tumor de CHC y de tejido no canceroso de la parte del tejido del hígado extraído del paciente. Luego se aísla el ARN de las muestras de tejido usando cualquier método apropiado para la extracción de ARN pequeños que sea bien conocido en la técnica, tal como mediante el uso de TRIZOLTM. A continuación, se

somete el ARN purificado a RT-PCR usando cebadores específicos de miR-26 con el fin de determinar el nivel de expresión de miR-26 en los tejidos tumorales y no cancerosos. Si la expresión de miR-26 no es al menos 1,5 veces inferior en el tejido tumoral que en el tejido no canceroso, el paciente no tiene probabilidad de responder favorablemente a la terapia adyuvante con IFN- α . Por consiguiente, el paciente no recibe la terapia de IFN- α , pero se controlan sus signos postoperatorios de recurrencia de la enfermedad.

Ejemplo VI: Procedimientos de diagnóstico de pacientes con CHC

En un aspecto particular, en la presente memoria, se proporciona un método para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, carcinoma hepatocelular (CHC). El método incluye, en general, medir el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo del sujeto y determinar si una alteración en el nivel del producto génico miR de la muestra de ensayo, en relación con el nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, indica que el sujeto bien ya tiene o está en riesgo de desarrollar CHC. En ciertas realizaciones, el nivel del al menos un producto génico miR se mide usando análisis de transferencia Northern. Además, en ciertas realizaciones, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es inferior al nivel del producto génico miR correspondiente de la muestra de control, y/o el nivel del al menos un producto génico miR de la muestra de ensayo es superior al nivel del producto génico miR correspondiente de la muestra de control.

Ejemplo VII: Medición de productos génicos miR

El nivel del al menos un producto génico miR se puede medir mediante transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana; la hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana a una micromatriz que comprende sondas de oligonucleótidos específicas de miARN para proporcionar un perfil de hibridación de la muestra de ensayo; y la comparación del perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control. Una alteración de la señal de al menos un miARN indica que el sujeto bien tiene o esta en riesgo de desarrollar CHC.

Ejemplo VIII: Aplicaciones diagnósticas y terapéuticas

En otro aspecto, en la presente memoria, se proporcionan métodos de tratamiento de CHC en un sujeto, donde la señal de al menos un miARN, en relación con la señal generada a partir de la muestra de control, es desregulada (por ejemplo, infrarregulada y/o suprarregulada).

También se proporcionan en la presente memoria métodos para diagnosticar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un CHC asociado con uno o más marcadores de pronóstico adverso mediante transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana; la hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana a una micromatriz que comprende sondas de oligonucleótidos específicas de los miARN para proporcionar un perfil de hibridación de la muestra de ensayo; y la comparación del perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control. Una alteración de la señal indica que el sujeto bien tiene o esta en riesgo de desarrollar el cáncer.

En la presente memoria, también se proporcionan métodos de tratamiento del CHC en un sujeto que tiene CHC, en el que al menos un producto génico miR está infrarregulado o suprarregulado en las células cancerosas del sujeto en relación con las células de control. Cuando el uno o más producto génico miR están infrarregulados en las células cancerosas, el método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un producto génico miR aislado, de manera que se inhiba la proliferación de células cancerosas en el sujeto. Cuando uno o más productos génicos miR están suprarregulados en las células cancerosas, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto génico miR, de manera que se inhiba la proliferación de las células cancerosas en el sujeto.

También se proporcionan en la presente memoria métodos de tratamiento del CHC en un sujeto que comprenden: determinar la cantidad de al menos un producto génico miR en células de CHC, en relación con las células de control; y modificar la cantidad de producto génico miR expresado en las células de CHC mediante: la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un producto génico miR aislado, si la cantidad del producto génico miR expresado en las células cancerosas es inferior a la cantidad del producto génico miR expresado en las células de control, o la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto génico miR, si la cantidad del producto génico miR expresado en las células cancerosas es superior a la cantidad del producto génico miR expresado en las células de control, de modo que se inhiba la proliferación de las células cancerosas en el sujeto.

Ejemplo IX: Composiciones

También se proporcionan en la presente memoria composiciones farmacéuticas para el tratamiento del CHC que comprenden al menos un producto génico miR aislado y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico miR aislado

correspondiente a un producto génico miR que está infrarregulado en células de CHC en relación con las células de control adecuadas. En ciertas realizaciones, el producto génico miR comprende una o más de las SEC ID N°: 1-5.

5 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.

10 También se proporcionan en la presente memoria composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un compuesto regulador de la expresión de miR que es específico de un producto génico de miR que está suprarregulado o infrarregulado en células de CHC en relación con las células de control adecuadas.

15 También se proporcionan en la presente memoria métodos para identificar un agente contra el CHC, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR asociado con la disminución de los niveles de expresión en células de CHC, en el que un aumento en el nivel del producto génico miR en la célula, en relación con una célula de control adecuada, indica que el agente de ensayo es un agente contra el CHC. En ciertas realizaciones, el producto génico miR comprende uno o más de las SEC ID N°: 1-5.

20 También se proporcionan en la presente memoria métodos para identificar un agente contra el CHC que comprenden proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR asociado con el aumento de los niveles de expresión en células de CHC, en el que una disminución en el nivel del producto génico miR en la célula, en relación con una célula de control adecuada, indica que el agente de ensayo es un agente contra el CHC.

Ejemplo X: Kits

25 Cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, se incluyen en un kit los reactivos para el aislamiento de miARN, el marcaje de miARN y/o la evaluación de una población de miARN usando una matriz. El kit puede incluir además reactivos para crear o sintetizar sondas de miARN. Los kits comprenden, por lo tanto, en recipientes adecuados, una enzima para el marcaje de miARN mediante la incorporación de nucleótidos marcados o sin marcar que posteriormente se marcan.

30 También puede incluir uno o más tampones tales como tampón de reacción, tampón de marcaje, tampón de lavado o un tampón de hibridación, compuestos para la preparación de la sonda de miARN y componentes para el aislamiento de miARN. Otros kits pueden incluir componentes para la fabricación de una matriz de ácido nucleico que comprenda oligonucleótidos complementarios a miARN, y por lo tanto, pueden incluir, por ejemplo, un soporte sólido.

35 Para cualquier realización del kit, incluyendo una matriz, puede haber moléculas de ácido nucleico que contengan una secuencia que sea idéntica o complementaria a la totalidad o parte de cualquiera de las SED ID N°: 1-5.

40 Los componentes de los kits pueden estar envasados bien en medio acuoso o en forma liofilizada. El recipiente de los kits incluirá generalmente al menos un vial, un tubo de ensayo, un frasco, una botella, una jeringa u otros medios de contención en los que se pueda colocar un componente, y preferentemente, distribuido adecuadamente en alícuotas. Cuando hay más de un componente en el kit (el reactivo de marcaje y el marcador pueden estar envasados conjuntamente), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que se puedan colocar los componentes adicionales por separado. Sin embargo, un vial puede comprender varias combinaciones de los componentes. Los kits también incluirán normalmente un medio para contener los ácidos nucleicos, y cualquier otro recipiente para reactivos en un confinamiento cerrado para la venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir inyección o recipientes de plástico moldeados por soplado en los que se mantengan los viales deseados.

50 Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, prefiriéndose una solución acuosa estéril. Otras soluciones que se pueden incluir en un kit son aquellas soluciones que participan en el aislamiento y/o el enriquecimiento del miARN de una muestra mixta.

55 Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar como uno o varios polvos secos. Cuando los reactivos y/o los componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también se pueda proporcionar en otros recipientes. Los kits también pueden incluir componentes que faciliten el aislamiento del miARN marcado. También pueden incluir componentes que conserven o mantengan el miARN, o que protejan contra la degradación. Los componentes pueden estar libres de RNasa o proteger contra las ARNsas.

60 Además, los kits pueden comprender generalmente, en medios adecuados, recipientes distintos para cada reactivo o solución individual. El kit también puede 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 las variaciones que se pueden implementar. Se contempla que dichos reactivos son realizaciones de los kits de la invención. Además, los kits no se limitan a los elementos particulares identificados anteriormente, y pueden incluir cualquier reactivo usado para la manipulación o la caracterización de miARN.

65

También se contempla que es posible emplear cualquier realización descrita en el contexto de una matriz de miARN, de manera más general, en métodos de detección o creación de perfiles o kits de la divulgación. En otras palabras, cualquiera de las realizaciones que describen lo que puede estar incluido en una determinada matriz, se pueden poner en práctica en el contexto de la creación de perfiles de miARN de manera más general, y no es necesario que impliquen una matriz en sí.

También se contempla que cualquier kit, matriz, u otra técnica o herramienta de detección, o cualquier método puede implicar la creación de perfiles para cualquiera de estos miARN. Además, se contempla que cualquier realización descrita en el contexto de una matriz de miARN se puede implementar con o sin el formato matricial; en otras palabras, se puede detectar o evaluar cualquier miARN de una matriz de miARN STET en cualquier método de la invención de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la materia. El formato matricial no es necesario para la implementación de los métodos de detección y diagnóstico.

Los kits para el uso de matrices de miARN para aplicaciones terapéuticas, de pronóstico o de diagnóstico y dichos usos están contemplados por los inventores en la presente memoria. Los kits pueden incluir una matriz de miARN, así como la información relativa a un perfil de miARN convencional o normalizado para los miARN en la matriz. Además, en ciertas realizaciones, se puede incluir ARN o ADN de control en el kit. El ARN de control puede ser miARN que se puede usar como un control positivo para el marcaje y/o el análisis de matrices.

Los métodos y kits de las presentes enseñanzas se han descrito amplia y genéricamente en la presente memoria. Cada una de las agrupaciones de especies y agrupaciones subgenéricas más limitadas incluidas en la divulgación genérica también forman parte de las presentes enseñanzas. Esto incluye la descripción genérica de las presentes enseñanzas con una condición o limitación negativa eliminando cualquier tema del género, independientemente de si el material extirpado se cita específicamente en la presente memoria.

Ejemplo XI: Preparación y rastreo de matrices

También se proporciona en la presente memoria la preparación y el uso de matrices de miARN, que son macromatrices o micromatrices ordenadas de moléculas de ácidos nucleicos (sondas) que son totalmente o casi complementarias o idénticas a una pluralidad de moléculas de miARN o moléculas de miARN precursoras, y que se colocan sobre un material de soporte en una organización espacialmente separada. Las macromatrices suelen ser hojas de nitrocelulosa o nylon en las que se han aplicado puntualmente sondas. Las micromatrices sitúan las sondas de ácido nucleico más densamente, de modo que se pueden ajustar hasta 10.000 moléculas de ácido nucleico en una región normalmente de 1 a 4 centímetros cuadrados.

Las micromatrices se pueden fabricar mediante la aplicación puntual de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, genes, oligonucleótidos, etc., sobre sustratos o la fabricación de secuencias de oligonucleótidos *in situ* sobre un sustrato. Las moléculas de ácidos nucleicos fabricadas o aplicadas puntualmente se pueden aplicar en un patrón matricial de alta densidad de hasta aproximadamente 30 moléculas de ácido nucleico no idénticas por centímetro cuadrado o más, por ejemplo, hasta aproximadamente 100 o incluso 1.000 por centímetro cuadrado. Las micromatrices generalmente usan vidrio recubierto como soporte sólido, en contraste con el material a base de nitrocelulosa de las matrices de filtro. Al tener una matriz ordenada de muestras de ácidos nucleicos complementarios a miARN, es posible rastrear la posición de cada muestra y vincularla a la muestra original.

Los expertos en la materia conocen diversos dispositivos matriciales diferentes en los que hay asociados una pluralidad de diferentes sondas de ácido nucleico de forma estable con la superficie de un soporte sólido. Los sustratos útiles para matrices incluyen el nylon, el vidrio y el silicio. Las matrices pueden variar en una serie de diferentes formas, incluyendo la longitud media de la sonda, la secuencia o los tipos de sondas, la naturaleza del enlace entre la sonda y la superficie de la matriz, por ejemplo, covalente o no covalente, y similares. Los métodos de marcaje y detección descritos en la presente memoria y las matrices no están limitados en su utilidad con respecto a ningún parámetro, excepto que las sondas detecten miARN; por consiguiente, los métodos y las composiciones se pueden usar con diversos tipos de matrices de miARN diferentes.

En vista de las muchas realizaciones posibles en las que pueden aplicarse los principios de la presente invención, se debería reconocer que las realizaciones ilustradas solo son ejemplos preferidos de la invención y no deben tomarse como una limitación del alcance de la misma. Más bien, el alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones. Por lo tanto, los presentes inventores reivindican como su invención todo lo que pertenece al alcance de estas reivindicaciones

Referencias

- (1) Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. "Global cancer statistics", 2002, *CA Cancer J Clin* 2005; 55 (2) : 74- 108.
- (2) Llovet J. M., Bruix J., "Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chem- oembolization improves survival". *Hepatology* 2003; 37 (2): 429- 442.
- (3) Sun H. C., Tang Z. Y., Wang L. *et al.* "Postoperative interferon alpha treatment postponed recurrence and

- improved overall survival in patients after curative resection of HBV- related hepatocellular carcinoma: a randomized clinical trial". *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132 (7): 458- 465.
- (4) Lo C. M., Liu C. L., Chan S. C. *et al.* "A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant interferon therapy after resection of hepatocellular carcinoma". *Ann Surg* 2007; 245 (6): 831- 842.
- 5 (5) Clavien P. A. "Interferon: the magic bullet to prevent hepatocellular carcinoma recurrence after resection", *Ann Surg* 2007; 245 (6): 843- 845.
- (6) Llovet J. M., Ricci S., Mazzaferro V. *et al.* "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma". *N Engl J Med* 2008; 359 (4): 378- 390.
- 10 (7) Thorgeirsson S. S., Grisham J. W., "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma". *Nat Genet* 2002; 31 (4): 339- 346.
- (8) Budhu A., Wang X. W., "The role of cytokines in hepatocellular carcinoma". *J Leukoc Biol* 2006; 80 (6 : 1197- 1213.
- (9) El Serag H. B., Rudolph K. L., "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis". *Gastroenterology* 2007; 132 (7): 2557- 2576.
- 15 (10) Ghebranious N., Sell S., "Hepatitis B injury, male gender, aflatoxin, and p53 expression each contribute to hepatocarcinogenesis in transgenic mice". *Hepatology* 1998; 27 (2): 383- 391.
- (11) Nakatani T., Roy G., Fujimoto N., Asahara T., Ito A., "Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin". *Jpn J Cancer Res* 2001; 92 (3): 249- 256.
- 20 (12) Rogers A.B., Theve E. J., Feng Y. *et al.* "Hepatocellular carcinoma associated with liver-gender disruption in male mice". *Cancer Res* 2007; 67 (24): 11536- 11546.
- (13) Naugler W. E., Sakurai T., Kim S. *et al.*, "Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL- 6 production". *Science* 2007; 317 (5834): 121- 124.
- (14) Ng I. O., Ng M. M., Lai E. C., Fan S. T., "Better survival in female patients with hepatocellular carcinoma. Possible causes from a pathologic approach". *Cancer* 1995; 75 (1): 18- 22.
- 25 (15) Dohmen K., Shigematsu H., Irie K., Ishibashi H., "Longer survival in female than male with hepatocellular carcinoma". *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18 (3): 267- 272.
- (16) Tangkijvanich P., Mahachai V., Suwangool P., Poovorawan Y., "Gender difference in clinicopathologic features and survival of patients with hepatocellular carcinoma". *World J Gastroenterol* 2004; 10 (11): 1547- 1550.
- 30 (17) Ashizawa T., Okada R., Suzuki Y *et al.*, "Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: role of IL- 6 as a prognostic factor". *Gastric Cancer* 2005; 8 (2): 124- 131.
- (18) Porta C., De Amici M., Quaglini S. *et al.* "Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma". *Ann Oncol* 2008; 19 (2): 353- 358.
- 35 (19) Calin G. A, 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.
- (20) Lu J., Getz G., Miska E. A. *et al.* "MicroRNA expression profiles classify human cancers". *Nature* 2005; 435 (7043): 834-838.
- 40 (21) 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.
- (22) Budhu A., Jia H.L., Forgues M. *et al.* "Identification of metastasis- related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*" 2008; 47 (3): 897- 907.
- (23) Schetter A. J., Leung S. Y., Sohn J. J. *et al.* "MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma". *JAMA* 2008; 299 (4): 425- 436.
- 45 (24) Kim J. W., Ye Q., Forgues M. *et al.* "Cancer- associated molecular signature in the tissue samples of patients with cirrhosis". *Hepatology* 2004; 39 (2): 518- 527.
- (25) Budhu A., Forgues M., Ye Q.H. *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 (26) Ye Q. H., Qin L. X., 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.
- (27) Yamashita T., Forgues M., Wang W. *et al.* "EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma". *Cancer Res* 2008; 68 (5): 1451- 1461.
- 55 (28) Karin M., Greten F. R. "NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression". *Nat Rev Immunol* 2005; 5 (10): 749-759.
- (29) Thyrell L., Arulampalam V., Hjortsberg L., Farnebo M., Grander D., Pokroffente akaja T. K. "Interferon alpha induces cell death through interference with interleukin 6 signaling and inhibition of STAT3 activity". *Exp Cell Res* 2007; 313 (19): 4015- 4024.
- 60 (30) Wands J. "Hepatocellular carcinoma and sex". *N Engl J Med* 2007; 357(19): 1974-1976.

Listado de secuencias

<110> Wang, Xin W. Ji, Junfang Croce, Carlo M. Tang, Zhao-You Sun, Hui-Chuan

5 <120> USO MICROARN-26 COMO MARCADOR PREDICTIVO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR, RESULTADO CLÍNICO Y RESPUESTA A TERAPIA CON INTERFERÓN

<130> 4239-81300-01

10 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
<211> 77
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 1

guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaaugggcc uauucuuggu 60

uacuugcacg gggacgc 77

25 <210> 2
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ggcuguggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu 60

gauuacuugu uucuggaggc agcu 84

30

35 <210> 3
<211> 77
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua 60

cuuggcucgg ggaccgg 77

40

45 <210> 4
<211> 22
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

uucaaguaau ccaggauagg cu 22

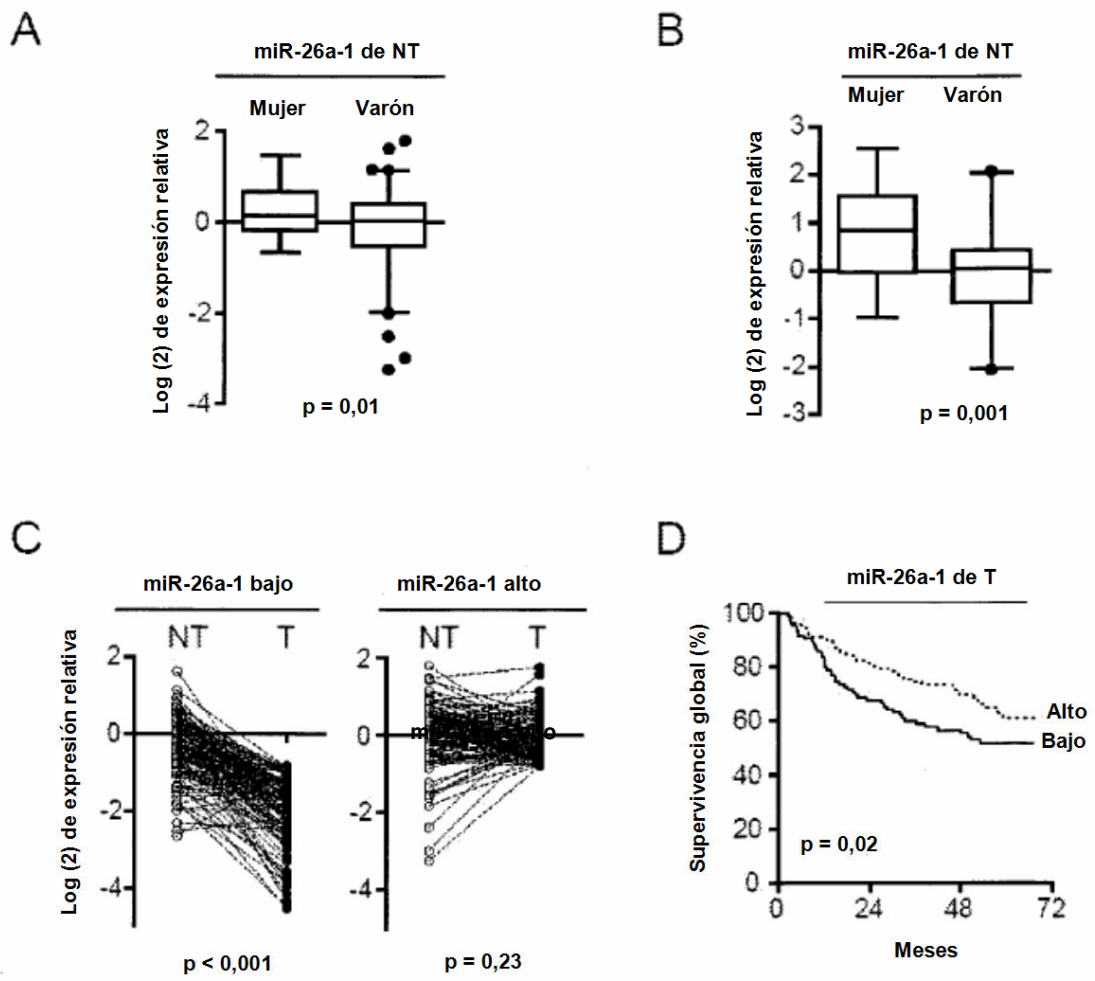
50 <210> 5
<211> 21
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 5

uucaaguaau ucaggauagg u 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para predecir el resultado clínico de un paciente a quien se ha diagnosticado carcinoma hepatocelular (CHC) que comprende detectar el nivel de expresión de miR-26 en una muestra de tumor de CHC que se ha obtenido del paciente, en el que una disminución de 1,5 veces o superior del nivel de expresión de miR-26 en la muestra de tumor con respecto a un control predice una disminución de la supervivencia, predice una respuesta favorable a la terapia con interferón (IFN)- α , o ambas cosas, en el que el resultado clínico es una respuesta favorable a la terapia con interferón.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que miR-26 es miR-26a-1, miR-26a-2, miR-26b o una combinación de los mismos.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que el control es una muestra de tejido no canceroso que se ha obtenido del paciente, una muestra de hígado de un sujeto sano o un valor de referencia.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la expresión de miR-26 en la muestra de tumor es disminuida al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 3,5 veces o al menos 4 veces.
- 20 5. Un método de selección de un paciente a quien se ha diagnosticado CHC como un candidato para la terapia de IFN- α , que comprende detectar el nivel de expresión de miR-26 en una muestra de tumor de CHC obtenida del paciente, en el que la disminución de 1,5 veces o superior del nivel de expresión de miR-26 en la muestra de tumor en relación con un control indica que el paciente es un candidato para la terapia con IFN- α .
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que miR-26 es miR-26a-1, miR-26a-2, miR-26b, precursores de los mismos, variaciones alélicas y una combinación de los mismos.
7. El método de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, en el que el control es una muestra de tejido no canceroso que se ha obtenido del paciente, una muestra de hígado de un sujeto sano o un valor de referencia.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que la expresión de miR-26 en la muestra de tumor es disminuida al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 3,5 veces o al menos 4 veces.



Figuras 1A-1D

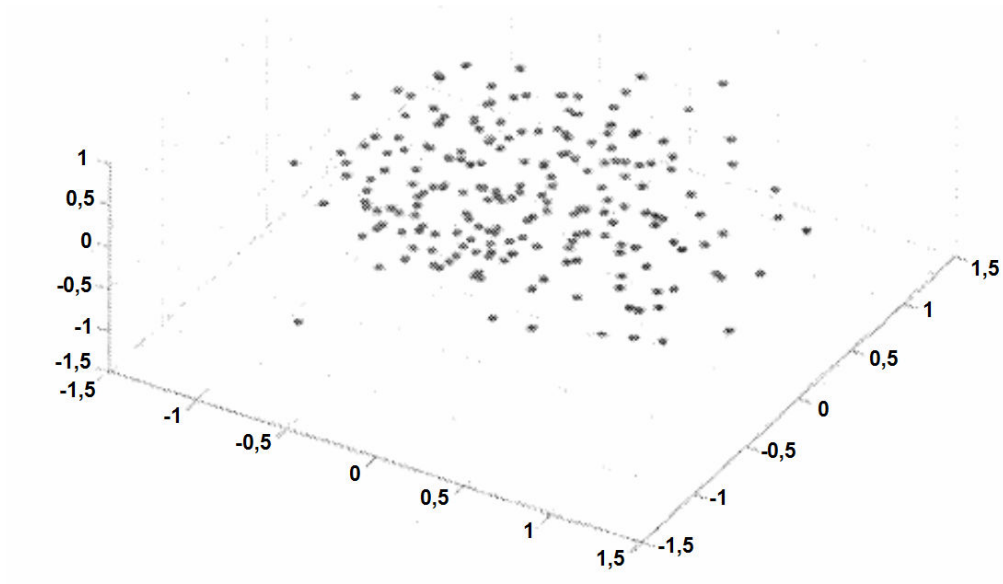


Figura 2

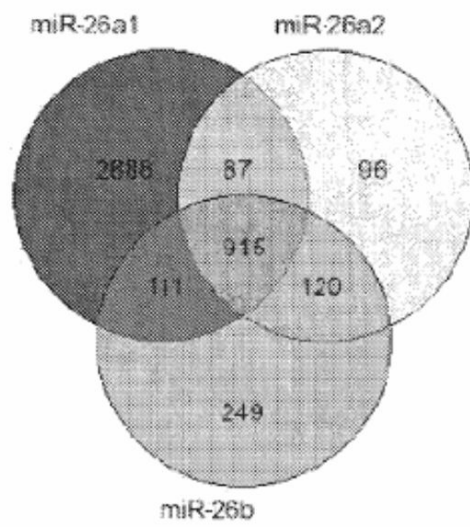


Figura 2B

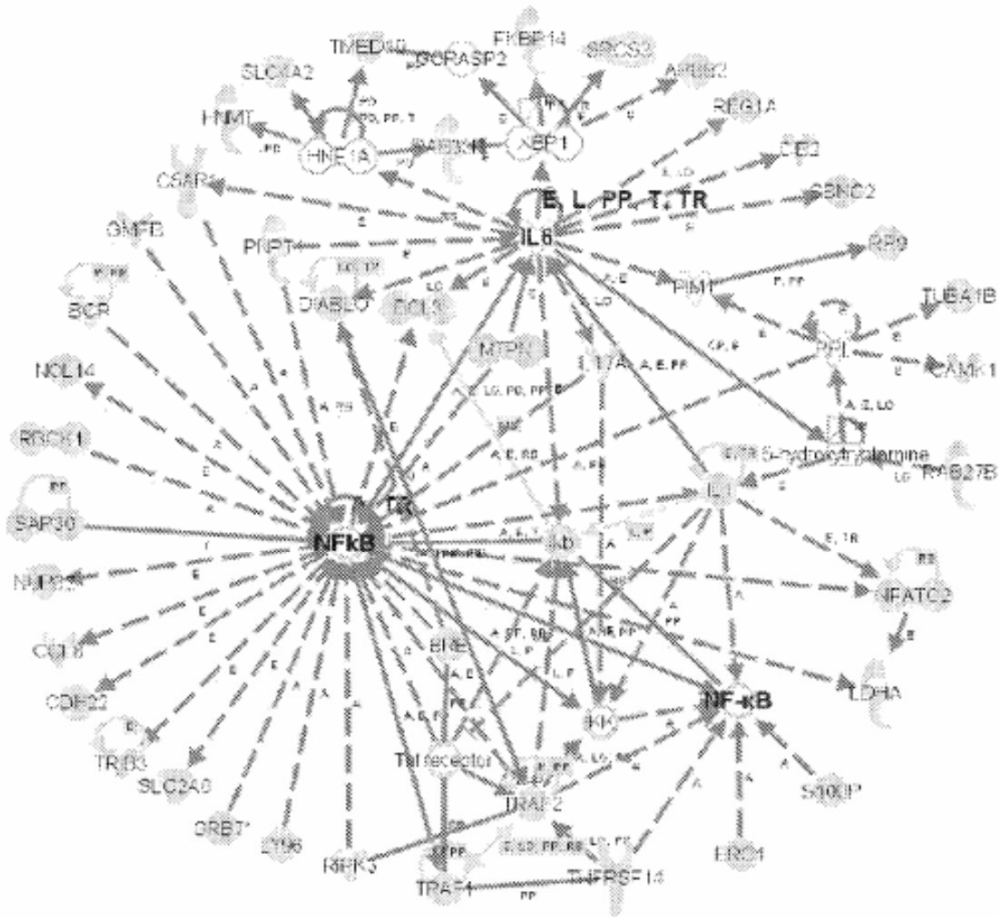
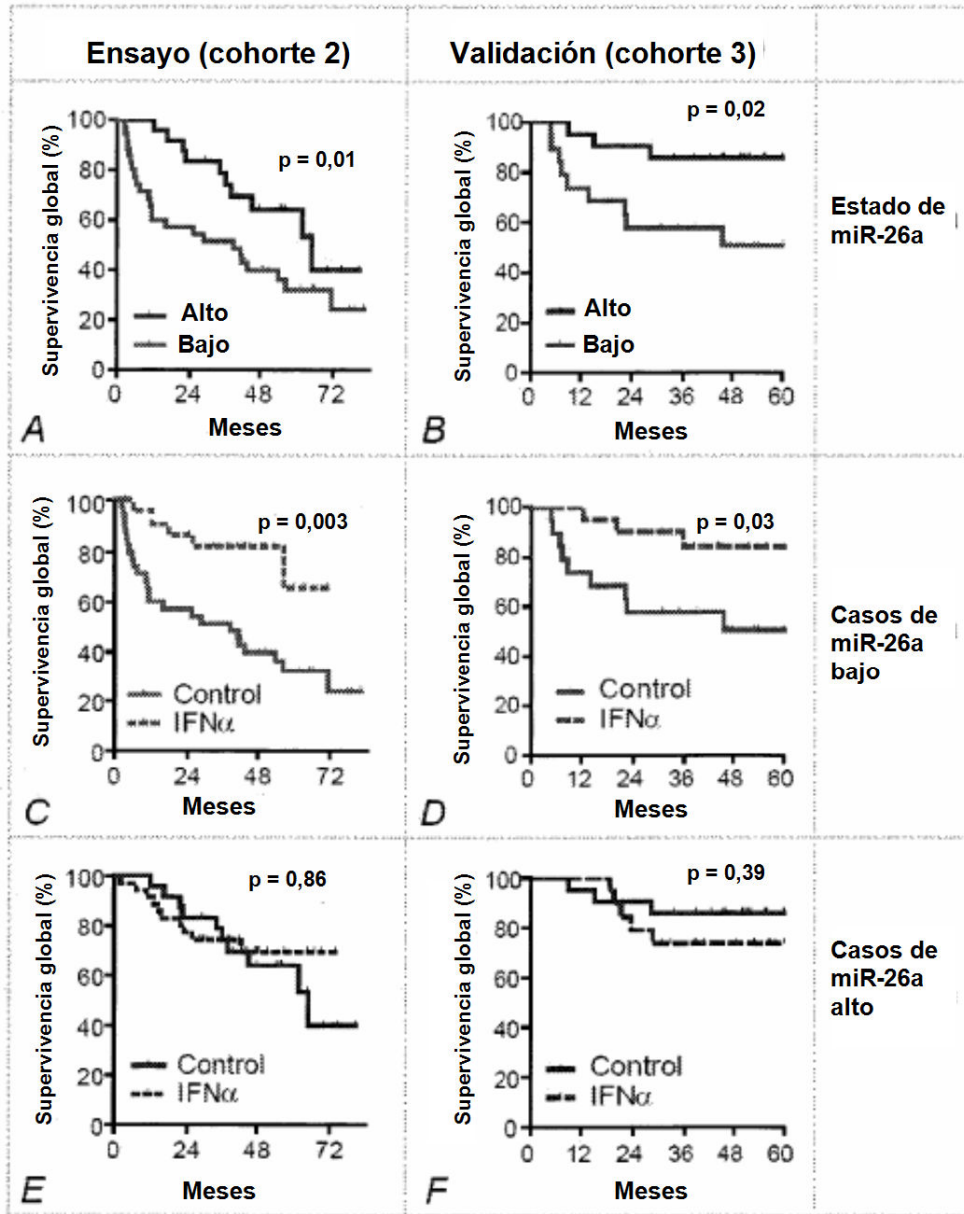


Figura 2C



Figuras 3A-3F

Tabla 1 A. Características clínicas de los sujetos			
Variable clínica	Cohorte 1 (n = 241)	Cohorte 2 (n = 135)	Valor de p
Género			
Mujer	30	14	
Varón	211	111	0,87 ^a
Sin datos	0	10	
Edad-años			
Mediana (intervalo)	50 (13-83)	50 (20-77)	0,29 ^b
Alanina transaminasa (ALT)			
Normal (≤ 50 U/l)	145	107	
Anómala (> 50 U/l)	96	16	$< 0,001^a$
Sin datos	0	12	
VHB			
Negativo	16	6	
Positivo	224	118	0,64 ^a
Sin datos	1	11	
Tamaño del tumor-cm			
≤ 3	88	46	
> 3	153	78	0,91 ^a
Sin datos	0	11	
Multinodular			
No	214	107	
Sí	27	17	0,50 ^a
Sin datos	0	11	
Cirrosis			
No	17	16	
Sí	223	108	0,08 ^a
Sin datos	1	11	
Fase TNM			
I	97	81	
II	90	29	
III-IV	54	14	$< 0,001^c$
Sin datos	0	11	
Fetoproteína alfa (AFP)			
Negativa (≤ 20 ng/ml)	77	49	
Positiva (> 20 ng/ml)	162	75	0,20 ^a
Sin datos	2	11	
Terapia adyuvante**			
Sí	39	72	
No	202	63	$< 0,001^a$
Supervivencia-meses			
Mediana (intervalo)	>60 (2-67)	67 (2-82)	0,89 ^d

^aprueba exacta de Fisher; ^bprueba t de Student para muestras no relacionadas; ^cprueba del Chi cuadrado; ^dprueba de rangos logarítmicos.

** Cohorte 1: Quimioembolización transarterial (TACE) (n = 34); Quimioterapia (n = 3); IFN α (n = 1); terapia con células asesinas activadas por linfocina (LAK) (n = 1); Cohorte 2: IFN α (n = 72).

Figura 4A - Tabla 1

Tabla complementaria 1. Características clínicas de dos ensayos clínicos independientes

Variable clínica	Ensayo con IFN (Cohorte 2) (n = 135)	Validación del IFN (Cohorte 3) (n = 79)	Valor de p
Género			
Mujer	14	14	
Varón	111	65	0,21 ^a
Sin datos	10	0	
Edad-años			
Mediana (intervalo)	50 (20-77)	52 (24-75)	0,23 ^b
Alanina transaminasa (ALT)			
Normal (≤ 50 U/l)	107	44	
Anómala (> 50 U/l)	16	35	$< 0,001^a$
Sin datos	12	0	
VHB			
Negativo	6	9	
Positivo	118	70	0,10 ^a
Sin datos	11	0	
Tamaño del tumor-cm			
≤ 3	46	22	
> 3	78	57	0,22 ^a
Sin datos	11	0	
Multinodular			
No	107	63	
Sí	17	16	0,25 ^a
Sin datos	11	0	
Cirrosis			
No	16	0	
Sí	108	0	ND ^c
Sin datos	11	79	
Fase TNM			
I	81	7	
II	29	34	
III-IV	14	38	$< 0,001^d$
Sin datos	11	0	
Fetoproteína alfa (AFP)			
Negativa (≤ 20 ng/ml)	49	33	
Positiva (> 20 ng/ml)	75	46	0,77 ^a
Sin datos	11	0	
Terapia con IFNα			
Sí	72	39	
No	63	40	0,67 ^e
Supervivencia-meses			
Mediana (intervalo)	67 (2-82)	> 60 (5-60)	0,06 ^e

^aprueba exacta de Fisher; ^bprueba t de Student para muestras no relacionadas; ^cno disponible; ^dprueba del Chi cuadrado; ^eprueba de rangos logarítmicos.

Figura 4B – Tabla complementaria 1

Tabla complementaria 2. Características clínicas de los casos usados para buscar microARN relacionados con el género

Variable clínica	Valor de mujeres ³ (n = 30)	Valor de varones G1 (n = 31)	Valor de varones G2 (n = 31)	Valor de p ^b		
				Mujeres frente a varones G1	Mujeres frente a varones G2	Varones G1 frente a varones G2
Edad-años						
Mediana	52	52	52			
Intervalo	25-72	26-71	27-71	0,93 ^c	0,93 ^c	1,00 ^c
ALT^d						
Normal	24	20	18			
Anómala	6	11	13	0,26	0,10	0,80
Tamaño del tumor-cm						
≤ 3	16	9	10			
> 3	14	22	21	0,07	0,12	1,00
Multinodular						
No	25	27	26			
Sí	5	4	5	0,73	1,00	1,00
Fase TNM						
I	15	14	13			
II	11	7	9			
III	4	10	9	0,18 ^e	0,33 ^e	0,84 ^e
AFP^f						
Negativo	9	14	6			
Positivo	20	17	25	0,30	0,38	0,06
Sin datos	1	0	0			
Meses de supervivencia						
Intervalo	3,0-67,1	4,5-67,1	2,3-65,4	0,31 ^g	0,09 ^g	0 55 ^g

^aCada valor representa el número de pacientes.

^bPrueba exacta de Fisher.

^cPrueba t de Student para muestras no relacionadas.

^dNormal: < 50 (U/l); anómalo > 50 (U/l).

^ePrueba del Chi cuadrado.

^fNegativo: <20 (ng/ml); Positivo >20 (ng/ml).

^gPrueba de rangos logarítmicos.

Figura 4C - Tabla complementaria 2

Tabla 2. Análisis de regresión de Cox univariante y multivariante de los niveles de expresión de miR-26 y la supervivencia global en sujetos con HCC ^a		
Variable clínica	Proporción de riesgo (IC del 95 % ^b)	Valor de <i>p</i>
ANÁLISIS UNIVARIANTE^c		
<u>miARN-26a (bajo frente a alto)</u>	<u>2,3 (1,1-5,0)</u>	0,03
<u>miARN-26b (bajo frente a alto)</u>	<u>2,3 (1,1-4,9)</u>	0,04
Edad	1,0 (1,0-1,0)	0,41
Género (Varón frente a mujer)	1,4 (0,6-3,7)	0,47
AFP (> 20ng/ml frente a < 20ng/ml)	1,2 (0,6-2,5)	0,58
Cirrosis (sí frente a no)	0,7(0,3-1,8)	0,46
ALT (> 50 U/l frente a < 50 U/l)	1,2 (0,5-2,8)	0,73
Tamaño del tumor (> 3 cm frente a < 3 cm)	1,2 (0,6-2,4)	0,56
Encapsulación del tumor (no frente a sí)	1,3 (0,7-2,7)	0,39
Multinodular (sí frente a no)	1,1 (0,5-2,7)	0,81
Fase TNM (II-III frente a I)	2,2 (1,2-4,3)	0,02
ANÁLISIS MULTIVARIANTE para miR-26a		
<u>miARN-26 (bajo frente a alto)</u>	<u>2,2 (1,0-4,7)</u>	0,05
Fase TNM (II-III frente a I)	1,9(1,0-3,9)	0,05
Género (varón frente a mujer)	1,1 (0,4-2,8)	0,88
ANÁLISIS MULTIVARIANTE para miR-26b		
<u>miARN-26 (bajo frente a alto)</u>	<u>2,2 (1,1-4,9)</u>	0,04
Fase TNM (II-III frente a I)	2,1 (1,1-4,2)	0,03
Género (varón frente a mujer)	1,0 (0,4-2,6)	0,99
^a El análisis se realizó sobre los casos de control (n = 60) (cohorte 2) dicotomizados en el grupo de bajo nivel de miR-26a/b y el grupo de alto nivel de miR-26a/b; ^b IC del 95 %, intervalo de confianza del 95 %; ^c Análisis univariante de regresión de riesgos proporcionales de Cox; ^d Análisis multivariante de regresión de riesgos proporcionales de Cox; los valores significativos de <i>p</i> (< 0,05) están destacados en negrita.		

Figura 5A - Tabla 2

Tabla 3. Análisis de regresión de Cox univariante y multivariante de la terapia con interferón y la supervivencia global al cáncer en sujetos con expresión baja de miR-26 ^a		
Variable clínica	Proporción de riesgo (IC del 95 % ^b)	Valor de p
Casos con expresión baja de miR-26a (n = 59)		
ANÁLISIS UNIVARIANTE ^c		
Tratamiento (IFN frente al Control)	0,2 (0,1-0,6)	0,003
Edad	1,0 (1,0-1,0)	0,64
Género (varón frente a mujer)	1,3 (0,4-3,7)	0,65
AFP (> 20 ng/ml frente a < 20 ng/ml)	1,8 (0,8-4,1)	0,15
Cirrosis (sí frente a no)	0,7 (0,3-2,1)	0,57
ALT (> 50 U/l frente a < 50 U/l)	1,1 (0,4-3,0)	0,79
Tamaño del tumor (> 3 cm frente a < 3 cm)	1,7 (0,8-3,6)	0,15
Encapsulación del tumor (no frente a sí)	1,8(0,9-3,6)	0,12
Multinodular (sí frente a no)	0,9 (0,3-2,3)	0,82
Fase TNM (II-III frente a I)	2,7(1,3-5,5)	0,005
ANÁLISIS MULTIVARIANTE ^d		
Tratamiento (IFN frente al Control)	0,3 (0,1-0,7)	0,005
Fase TNM (II-III frente a I)	2,4 (1,2-4,9)	0,02
Género (varón frente a mujer)	1,4(0,5-4,0)	0,55
Casos con expresión baja de miR-26b (n = 58)		
ANÁLISIS UNIVARIANTE		
Tratamiento (IFN frente al Control)	0,4 (0,2-0,9)	0,04
Edad	1,0 (1,0-1,0)	0,82
Género (varón frente a mujer)	1,4 (0,4-4,7)	0,57
AFP (> 20 ng/ml frente a < 20 ng/ml)	1,9 (0,9-4,0)	0,10
Cirrosis (sí frente a no)	0,7 (0,3-1,8)	0,43
ALT (> 50 U/l frente a < 50 U/l)	1,9 (0,8-4,6)	0,17
Tamaño del tumor (> 3 cm frente a < 3 cm)	2,0 (1,0-4,3)	0,06
Encapsulación del tumor (no frente a sí)	1,6 (0,8-3,1)	0,20
Multinodular (sí frente a no)	1,1 (0,4-2,6)	0,87
Fase TNM (II-III frente a I)	2,7 (1,4-5,3)	0,004
ANÁLISIS MULTIVARIANTE		
Tratamiento (IFN frente al Control)	0,4 (0,2-0,9)	0,04
Fase TNM (II-III frente a I)	2,6 (1,3-5,1)	0,007
Género (varón frente a mujer)	1,5 (0,5-5,1)	0,48
^a El análisis se realizó sobre los casos con baja expresión de miR-26 de la cohorte 2; ^b IC del 95 %, intervalo de confianza del 95 %; ^c Análisis univariante de regresión de riesgos proporcionales de Cox; ^d Análisis multivariante de regresión de riesgos proporcionales de Cox; los valores significativos de p (< 0,05) están destacados en negrita.		

Figura 5B - Tabla 3

Tabla complementaria 3. Ocho microARN relacionados con el género

miARN relacionado con el género	Ubicación genómica	Valor de p paramétrico	Valor de p de permutación	Intensidades medias en mujeres	Intensidades medias en varones	Expresión en mujeres
Sin CHC						
miR-321 ^a	-	0,001	0,003	4585	2618	supra
miR-26a-1	3p22.3	0,01	0,01	19879	14417	supra
miR-10b	2q31.1	0,02	0,02	735	535	supra
miR-125b-1	11q24.1	0,02	0,02	4211	2838	supra
miR-99b	19q13.41	0,04	0,04	2628	2071	supra
miR-325	Xq21.1	0,05	0,06	1885	1146	supra
miR-342	14q32.2	0,04	0,03	306	373	infra
CHC						
miR-129-2	11p11.2	0,007	0,004	893	1179	infra

^amiR-321 se indica como un fragmento de Arg-ARNt.

Figura 6A – Tabla complementaria 3

Figura 6B - Tabla 4: Lista de las 20 primeras redes de genes del análisis de vías INGENUITY™				
ID	Genes de la vía	Puntuación*	Nº de Genes	Funciones principales
1	14-3-3, ACLY, CPOX, CTDSP1, Ciclina B, DAXX, DNM1, GAPDH, GML, HK3, HUWE1, IRF5, dímero Jnk, LRDD, MED22, MED28, Ndkp, NELF, NME1, NME2, PDCD2, PIN1, PKMYT1, ARN polimerasa II, RPS6KA1, Rsk, SFN, SNCAIP, STRAP, TBXAS1, TP53, TP53BP1, TTC5, ZBTB17, ZNF74	2	9	Cancer, señalización e interacción entre células, función celular y mantenimiento
2	AP3D1, ARRB1, ATP5E, ATP5I, ATP6V1D, Calmodulina, CCT6A, CD3EAP, CDC34, Ck2, DIRAS3, ENO1, actina F, G6PD, ATPasa de dos sectores transportadora de H+, IL1A, INA, Insulina, MAP6, MRPS10, peptidilprolilo isomerasa, PPIA, PTPRZ1, homólogo de Ras, RHOT2, RPS2, SFRS1, SFRS11, SHROOM3, SNRP70, STK11, SUGT1, TALDO1, UBA52, WNT2	0	8	Cancer, ciclo celular, metabolismo de hidratos de carbono
3	BCL3, BCR, BRE, C5AR1, CCL8, CDH22, DIABLO, ERC1, glutationa peroxidasa, GMFB, GRB7, Ikb, IKK, IL1, IL17A, LDHA, LY96, MTPN, NFATC2, NFkB, NOL14, NUP62, PNPT1, RBCK1, RIPK3, S100P, SAP30, SLC2A6, Sod, receptor Tnf, TNFRSF14, TRAF1, TRAF2, TRIB3	8	7	Muerte celular, expresión génica, metabolismo de hidratos de carbono

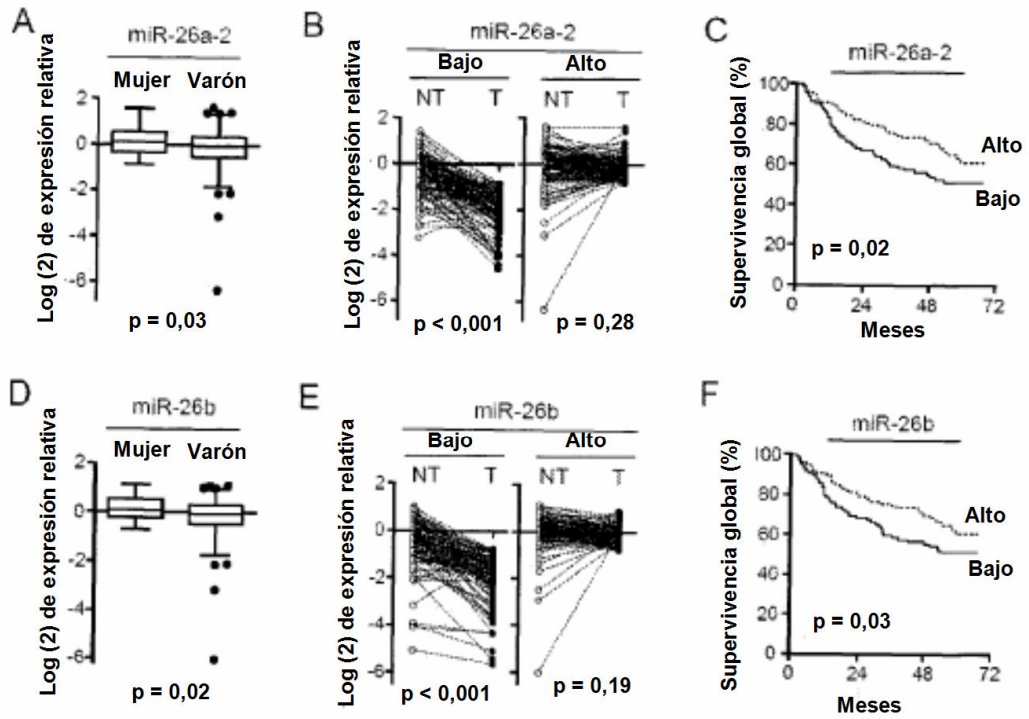
Figura 6B - Tabla 4: Lista de las 20 primeras redes de genes del análisis de vías INGENUITY™				
ID	Genes de la vía	Puntuación*	Nº de Genes	Funciones principales
4	Actina, proteína adaptadora 2, ALG5 , ATP13A2 , ATPasa , BCAR1 , BHLHB3 , BRUNOL4 , Caspasa, CENTD2 , Ciclina A, DDX11 , DDX39 , E2f, EID1 , GARNL1 , HIST1H2AG , Histona h3, HNRPK , KEAP1 , KHDRBS1 , MCM2 , MCM5 , PFDN4 , PFDN5 , PI3K, Rb, RUVBL1 , RUVBL2 , SYNCRIP , SYT3 , TCF3 , TGM2 , THOC1 , THOC2	6	6	Expresión génica, modificación de ARN posterior a la transcripción, transporte molecular
5	Akt, ALDOA , ATXN2L , Cbp/p300, CHFR , DGKZ , EPO , estrógeno Esrl, ETV6 , FAM14A , FAM89B , dímero GC-GCR, HMGB1 , IL12RB2 , INPP5E , JAK , MPL , N-cor, NCOR2 , NOSIP , NR0B1 , factor nuclear 1, OGG1 , PGR , PRMT2 , PTPRF , PTPRS (incluye EG:5802) , STAT , STAT2 , STAT5a/b, receptor de hormona tiroidea, TYK2 , TYR03 , UCN , WDR1	4	5	Crecimiento y proliferación celular, desarrollo y función de sistema inmune y linfático, morfología de tejidos
6	ADM , fosfatasa alcalina, Ap1 , ARHGEF6 , BIN1 , BMP2K , CAD , CCL4 , CD37 , CD209 , CSNK1E , Dinamina, ECE1 , ELK1 , ETV5 , Fgf, FGF4 , FGF12 , JUN/JUNB/JUND, LDL, Mapk, MAX , MHC Clase II, MSC , MXD3 , NPC2 , PLC gamma, PSMC3IP , SCARB2 , SLA.SPRY1 , SYK , Tgf beta, VAV , WIPF1	2	4	Función y mantenimiento celular, compromiso celular, desarrollo y función del sistema inmune y linfático
7	B2M , BCL7B , CD3, DUB, EEF2 , GPR109B , Gsk3, Hexocinasa, HK1 , Ige, IGHG1 , IL10 , JUN , KLRC3 , MAFK , Mek, MHC Clase I, MYB , Nfat , NMB , Rap1, Ras, RASSF5 , RELB , RIT1 , SAMD4A , SCRIB , SIT1 , Sos, SPI1 , TCR, TYROBP , USP11 , USP22 , USP33	0	3	Desarrollo y función del sistema inmune y linfático, morfología de tejidos, trastorno del desarrollo
8	ADA , Adenilato ciclasa, ARF5 , CACNG2 , CALCB , Calpaína, CaMKII, CAPN3 , CAPN10 , COROIB , Creb, ERK1/2, proteína G beta, GLMN , GNAO1 , GNB5 , GRM3 , HSF2 , Integrina, ITGAM , KPNB1 , MAG , MMP1 , PDGF BB, Pka, Pkc(s), PLC, Pld, PP2A, PPP2R5B , RPS6KB1 , SLC32A1 , SNAP23 , SNRPA , SYNE1	8	2	Metabolismo de aminoácidos, ciclo celular, señalización e interacción de célula a célula
9	ADRB1 , fosfotransferasa aceptora de grupos alcohol, AMPK , proteína/s de calcineurina, CUL5 , ARN polimerasa dirigida a ADN, EWSR1 , FZR1 , GRK4 , GTF2A2 , HCFC1 , Hsp70, Hsp90, Jnk, LDB3 , LIMK1 , Mek1/2, MYOZ3 , Nos, NOS1 , P38 MAPK, p70 S6k, Pak, PAK2 , Pdgf, POLR1D , POLR2A , POLR2E , Rac, RRM2 , SETD1A , TFIIA, TK1 , TOM1 , Ubiquitina	2	9	Comportamiento, metabolismo de aminoácidos, cáncer
10	ADCYAP1 , ANKRD11 , BET1L , beta estradiol, CPLX2 , CREB1 , ESRRA , FAM 105A , FHL5 , GALNT7 , GOSR1 , HEXIM1 , HEXIM2 , NADH2 deshidrogenasa (ubiquinona), NAPB , NAPG , NCOA1 , NC.OA2 , NDUFA3 , NDUFA7 ,	7	6	Expresión génica, muerte celular, desarrollo y función de tejidos conjuntivos

Figura 6B - Tabla 4:
Lista de las 20 primeras redes de genes del análisis de vías INGENUITY™

ID	Genes de la vía	Puntuación*	Nº de Genes	Funciones principales
	NDUFA10 , NDUFC1, NDUFC2, NDUFS6, NDUFV3, fosfato, PRPF31 , REST, SNAP25, Snare, TRIM9 , TSPAN14 , UIIRF1BP1, UQCR			
11	ACPP , beta-estradiol, C11ORFIO , CFD , CHST3, CHST12, CHST13, GSTM3 , HES1, HS3ST2, HS3ST5, FIS3ST6, HS3ST3A1 , HS3ST3B1, HS3ST4, LAGE3 , LHFPL2 , MMD , MX2 , NUDT1 , PFKL , PPRC1 , RBM15 , SAPS2 , SMP2A, sulfotransferasa, SULT1A2, SULT1A4, SULT1B1, SULT1C2, SULT1C3, SULT1C4, SULT4A1, TMEM37 , LIST	6	5	Metabolismo de hidratos de carbono, bioquímica de moléculas pequeñas, metabolismo de aminoácidos
12	ANAPC11 , AOAH , BUB1, DNAJA2, DNAJB1, DNAJB5 , ENC1, FKBP15 , GBP5 , GCLM, HSPA9, peróxido de hidrógeno, IF16, IFNB1, LILRA2 , LILRB3 , LRRC47 , MRPL20 , NFE2L2, OSGIN1, PFDN5 , PRDX6, PSMD, PSMD1 , PSMD2 , PSMD5, PSMD7, PSMD9, PSMD12, RAE1, RPL5 , SNCA, UQCRFS1, UQCRH , XAF1	6	5	Cáncer, muerte celular, compromiso celular
13	ARHGEF2, C200RF117 , CDC45L, CDCA7L , CTSL2, CYFIP2, EXOSC1 , EXOSC2, EXOSC3, EXOSC4, EXOSC5, EXOSC7, EXOSC8, EXOSC9, FXC1 , GAS 1, IFI202B, INSR, MAP4, MARK4, MNT, MXI1, MYBBP1A , MYC, NOL5A , NUDC , PLEKHF1 , PRL2C2, RPL32 , RPS13 , RPS20 , RPS15A , STRA13 , SURF6 , XRN1	4	4	Modificación de ARN posterior a la transcripción, ciclo celular, desarrollo y función del tejido conjuntivo
14	5-hidroxitriptamina, 5-hidroxitriptófano, APBB2 , CAMK1 , CIB2 , DNAJC3, FKBP2, FKBP7, FKBP10, FKBP11, FKBP14 , FKBP1B, GORASP2, GPNMB, HNF1A, HNMT , IL6, MIA2, PBSN, PDIA2, PIM1, PPIB, PRL, RAB27B , RAB33B , RABAC1, REG1A , RP9 , SBN02 , SLC4A2 , SPCS3 , TMED10 , TUBA1B , UNCI3D, XBP1	4	4	Transporte molecular, bioquímica de moléculas pequeñas, cáncer
15	ACOT7 , APEX 1, ARL4A, ARNT2, CALB2 , CCNG2, CCS, CHD2 , CNDP2 , FAM50A , FKBP3, G6PD2, GAK , GREM2 , GSTA3, HGF, HGFAC, HIF1A, IGF2, IL13RA2, IRS2, KLK1B9, KLK1B22, KRT5 , PCSK4 , PNRC1, progesterona, RAB20 , REG1B , RNF103, SMUG1 , SPSB1, STAT3, TSSK2 , ZNF592	4	4	Cáncer, movimiento celular, enfermedad gastrointestinal
16	ADAMTS7 , ARSB, ARSC2, ARSD, ARSE, ARSF, ARSG, ARSH, ARSI, ARSJ, ARSK, Aril-sulfatasa, B4GALT3 , CDKN2A, GCM1 , GTSE1, HRAS, ING1 , MIF, NANOG , NSUN5C , OTP, RECQL4, RPL39 , S100B, SELPLG, SULF2 , TIMM13 , TOPORS, TP53 , TPP1 , TTC1 , ZMAT3, Zn ²⁺ , ZNF408	4	4	Compromiso celular, cáncer, morfología tumoral

Figura 6B - Tabla 4: Lista de las 20 primeras redes de genes del análisis de vías INGENUITY™				
ID	Genes de la vía	Puntuación*	Nº de Genes	Funciones principales
17	AP2A1, ARL4C, ATP, BATF3, BCKDK , C140RF153 , C90RF86 , CASP3, CD40LG, CEBPA, CHKB , DDX21, Etanolamina cinasa, ETNK1 , GRSF1 , IL2, INCENP , KIF2A , KLRB1 , LST1 , MAGEA3, MRPS12 , MT1H, MT2A, PDCD1LG2, RNASE3, SERPINB1 , SPINK7, SWAP70, TBCD , TNFRSF13C, TUBA3C, TUBB2A, TUBG1	4	4	Cáncer, enfermedad infecciosa, crecimiento y proliferación celular
18	Aminoácidos, APP, BTK, CDC2L2 , CHAT, CLSTN1, CPM , DAPK3 , DGUOK , DPYSL2, DUSP7 , DYNC111, FANCC , FER, FPRL1, FYB, HOMER 1, IBTK , ICMT , KIF5A, KIF5B, KIF5C, KLC1 , KLC2 , LILRA6, MAPK8IP2, MAPK8IP3, MPZL1 , PHKG2 , PHLDA2 , PPME1, PTPN11, SPTAN1, ST8SIA1, TXK	3	3	Metabolismo de aminoácidos, modificación posterior a la traducción, bioquímica de moléculas pequeñas
19	ARHGAP10, ARHGAP26, BCLAF1, Ck2, DEDD , DEDD2 , DSG2 , EGF, EIF5, EIF4A2 , EIF4E, EIE4G3, GLE1, GTP, MYCBPAP , NOL3, NUP155, NUPL2, PLEKHG5 , POP1, POP4, POP7 , PXN, RAB11B , REPS1 , RHOA, RHPN2 , RND2, RPP21 , RPP30, RPP38, RPP40, SAFB2 , TCOF1, UBOX5	3	3	Síntesis de proteínas, señalización celular, replicación, recombinación y reparación del ADN
20	AATF, BUB3 , BUB1, C170RF49 , CDKN1A, CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C , CPSF3, GSTF2, EAF1 , ELL, ELL2, F2, HSPA9, IL32, LRSAM1 , MET, MGRN1 , MLL, NCBP2, NCBP1 , PDCD6IP, SPSB2 , SRM , STAMPB , SYMPK, TSG101, TUBG2 , UBE2S, VPS24, VPS28, VPS37C , VPS4A, ZNF205	3	3	Modificación del ARN posterior a la transcripción, desarrollo celular, enfermedad hematológica

Figura 6B – Tabla 4



Figuras 7A-7F

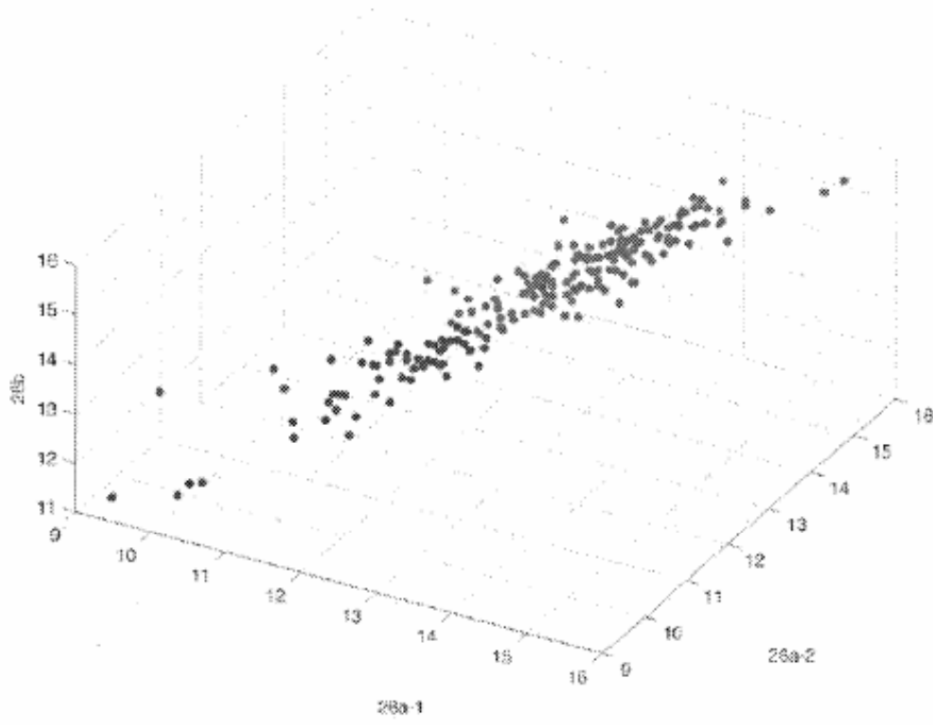
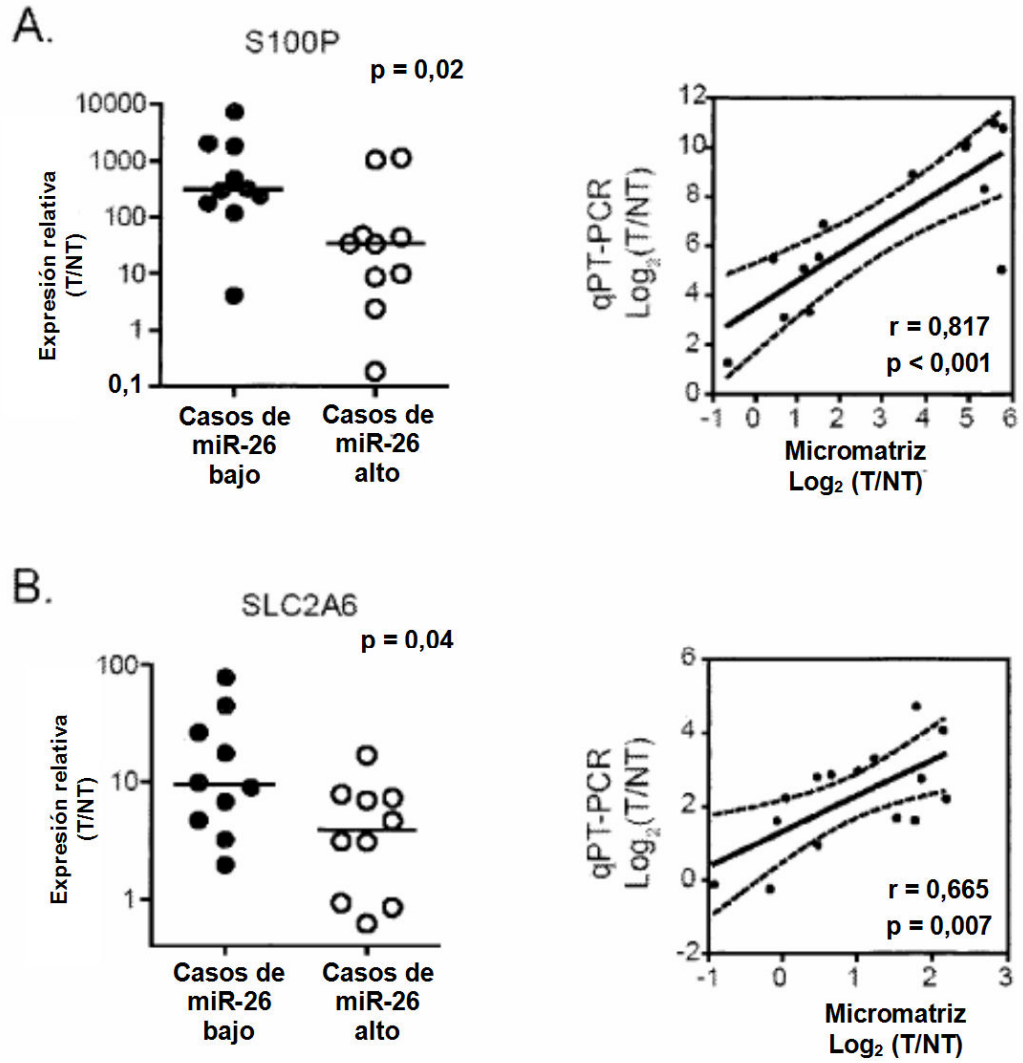
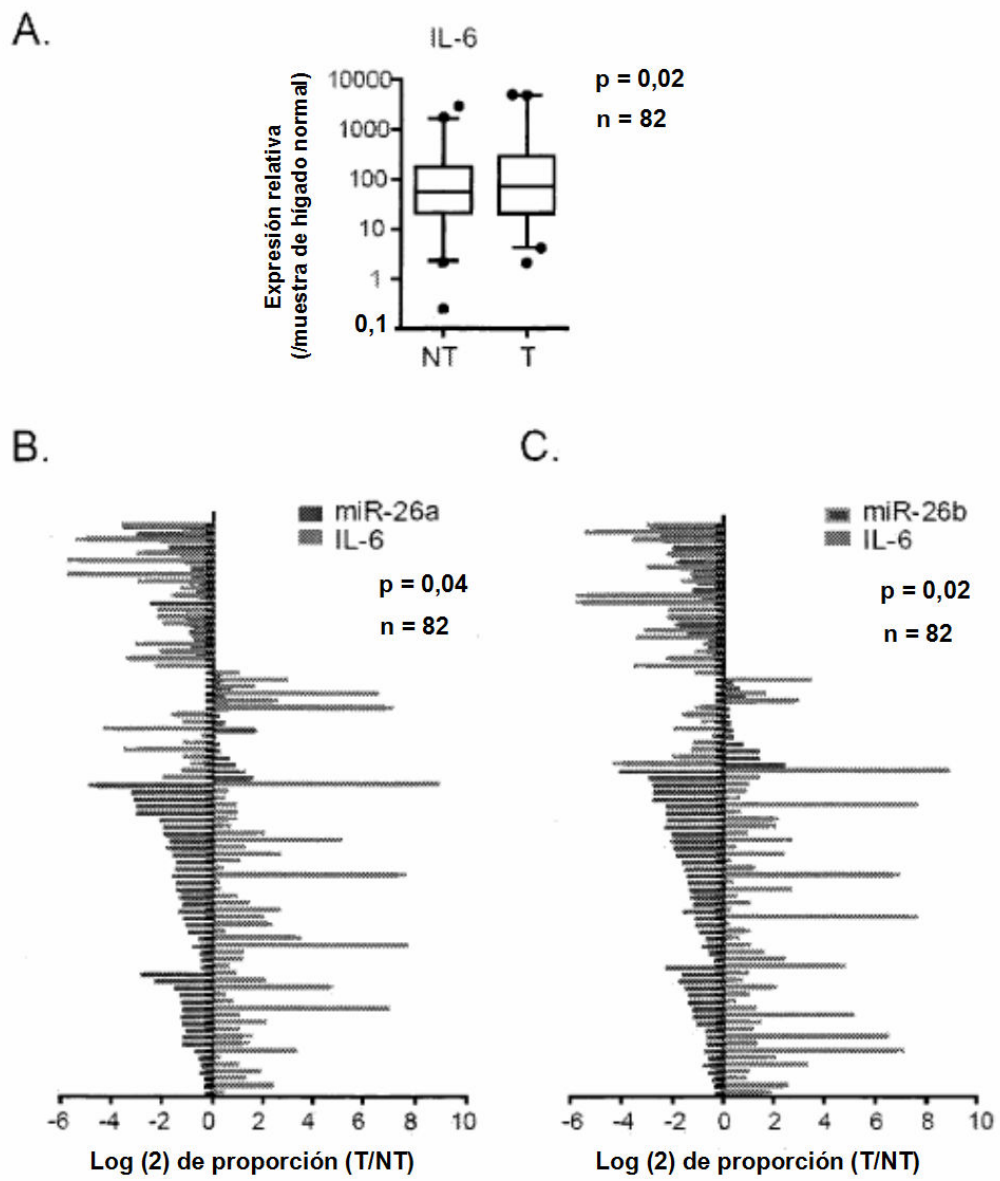


Figura 8



Figuras 9A-9B



Figuras 10A-10C

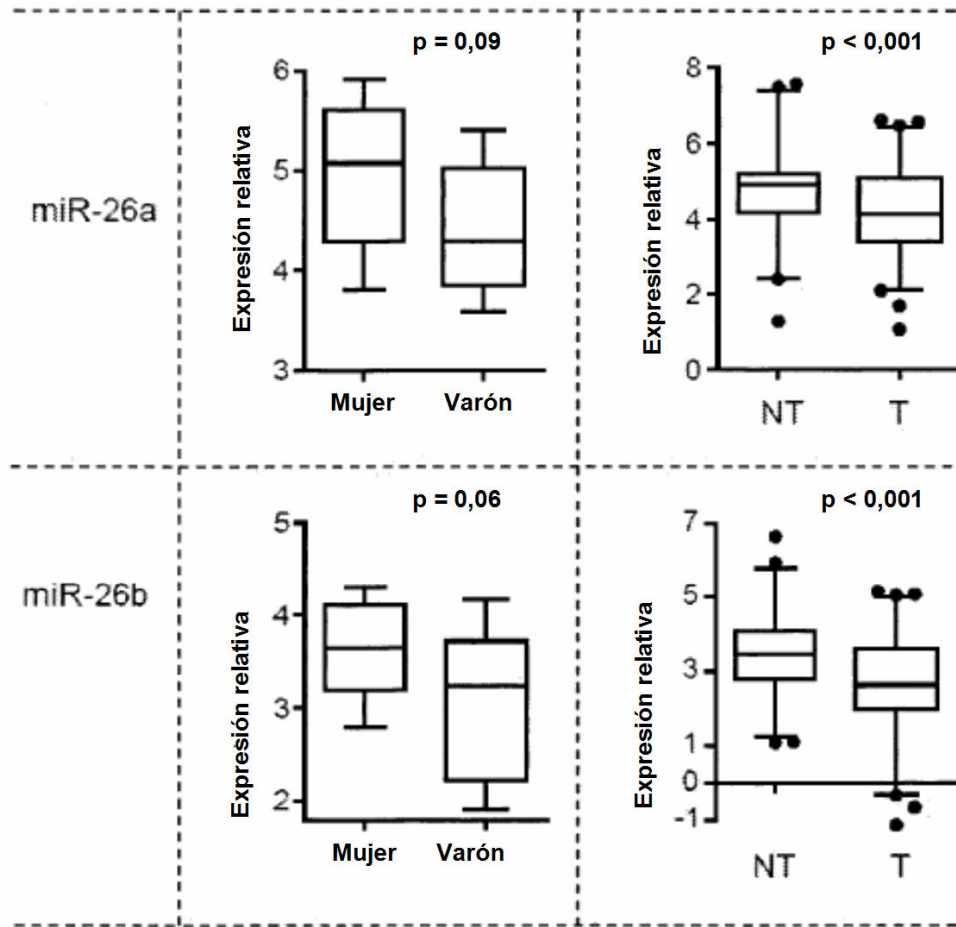
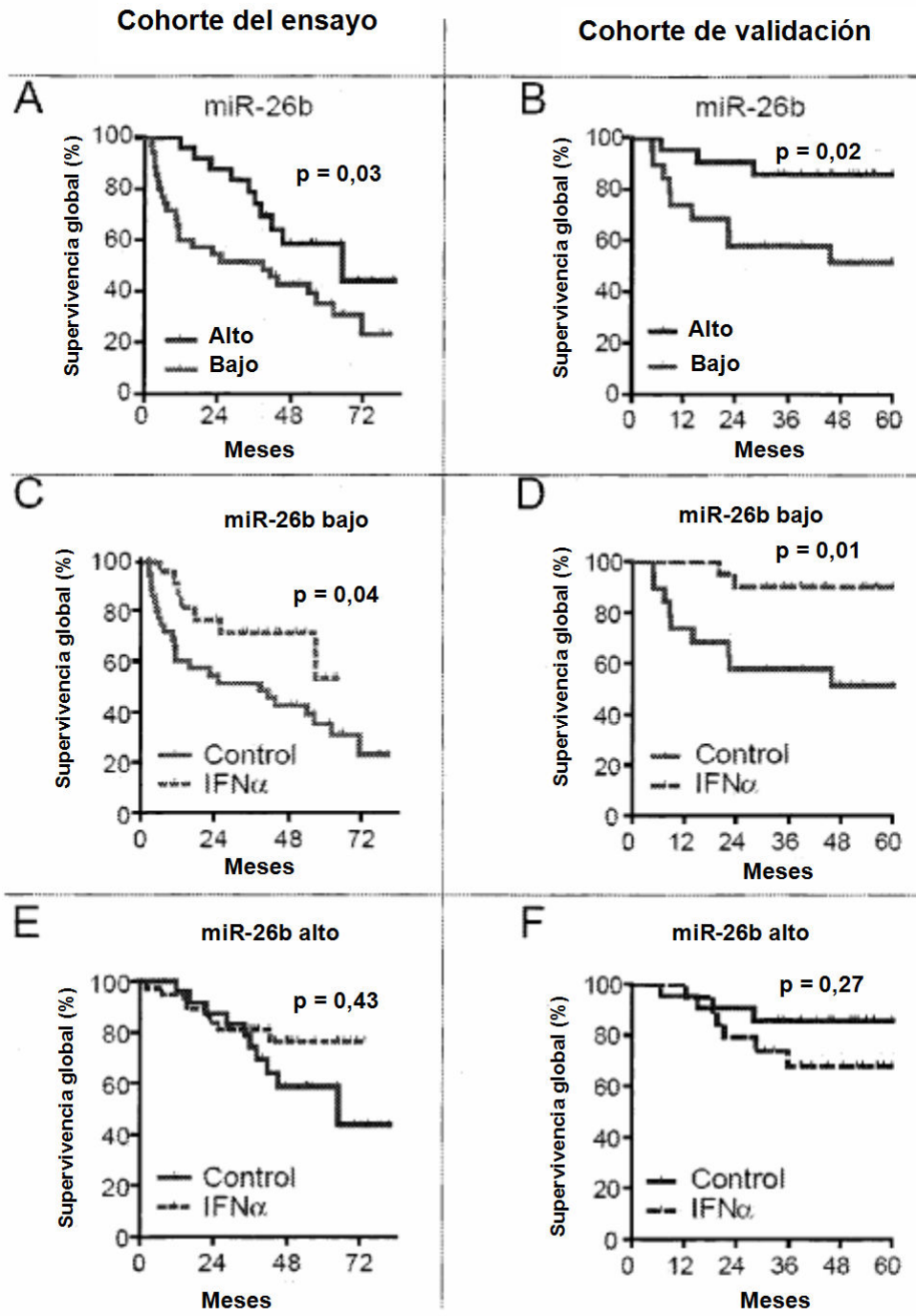


Figura 11



Figuras 12A-12F

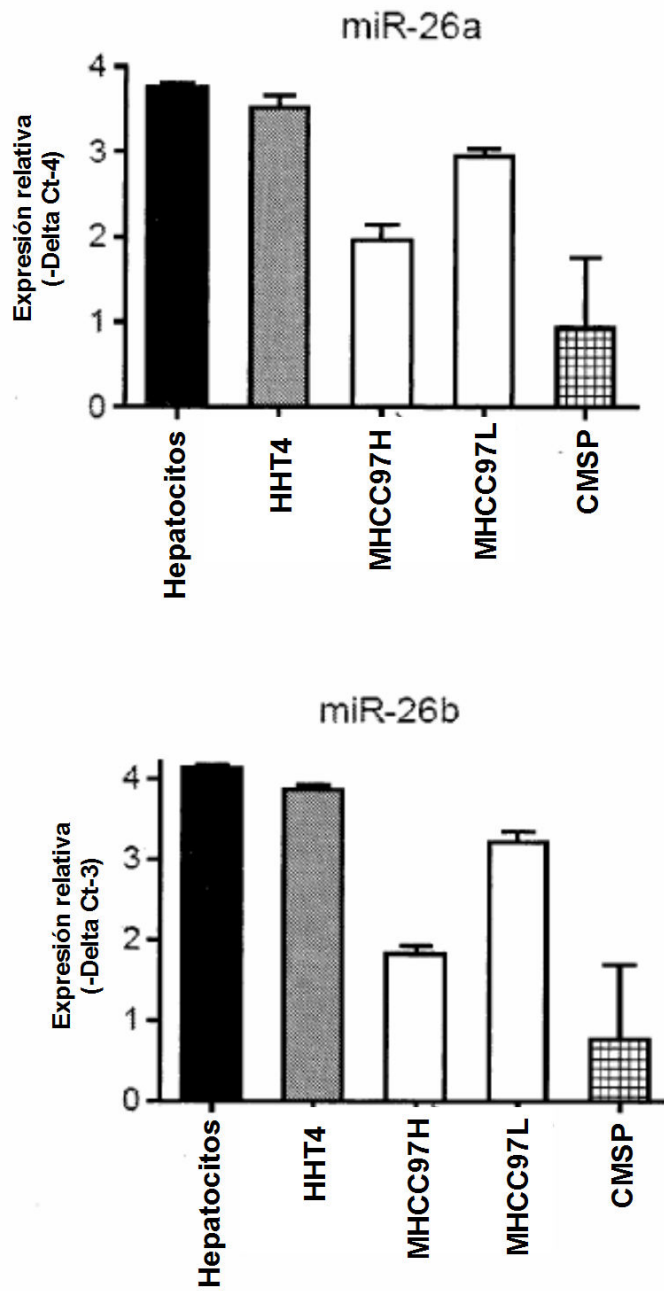


Figura 13

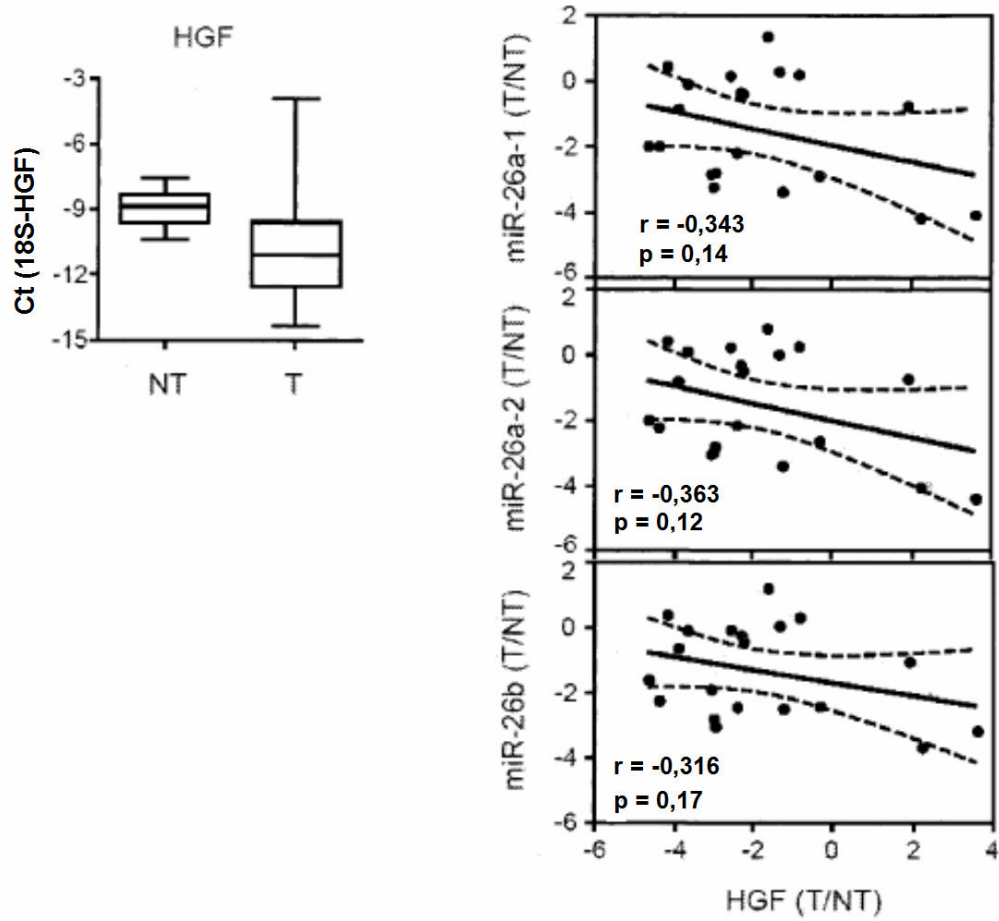


Figura 14

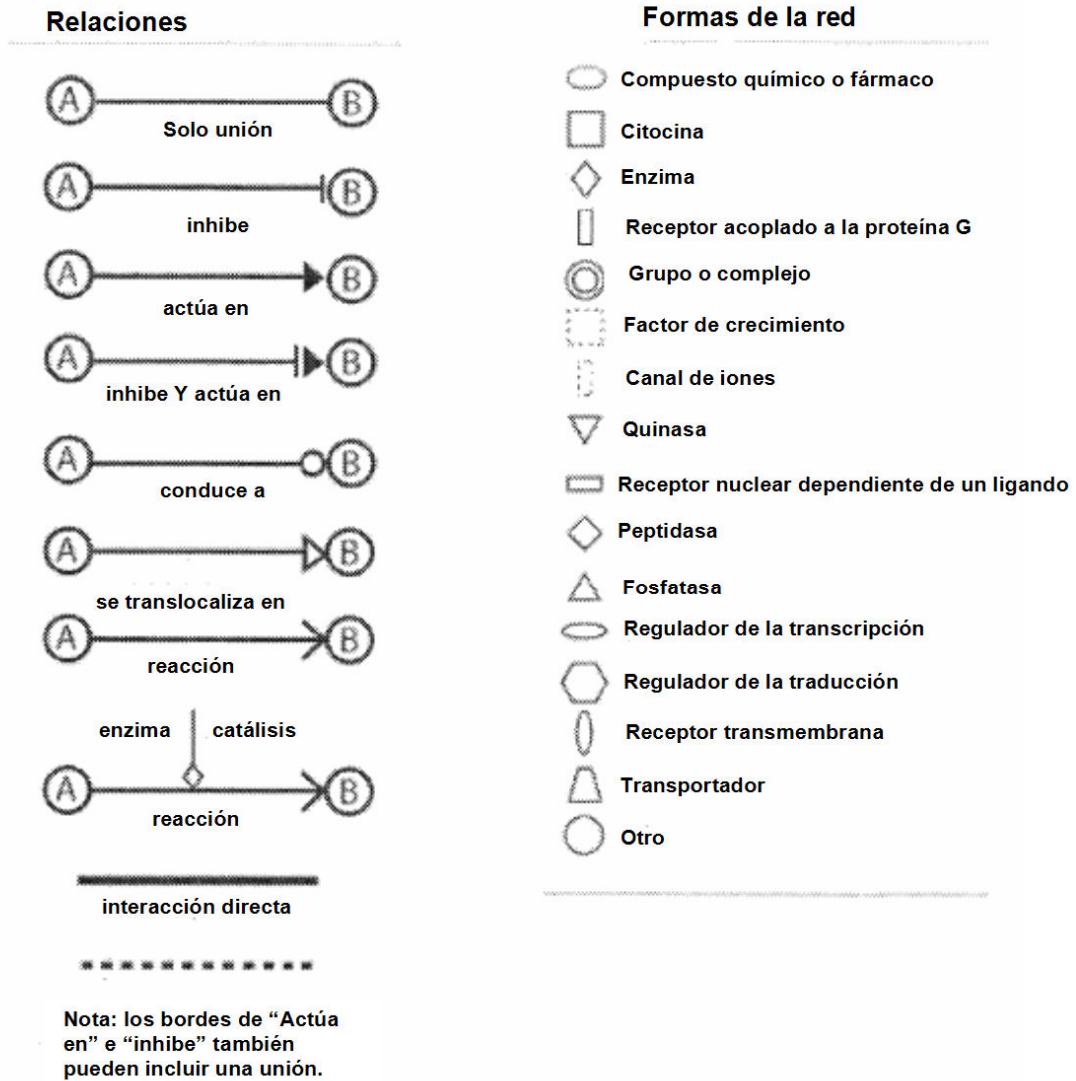


Figura 15