(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 434 075**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2007 E 11196261 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2436784**

(54) Título: **MIR-203 para el diagnóstico de adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia**

(30) Prioridad:

13.07.2006 US 807304 P
01.06.2007 US 932736 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2013

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

CROCE, CARLO;
SCHETTER, AARON y
HARRIS, CURTIS

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

DESCRIPCIÓN

MIR-203 para el diagnóstico de adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia

Antecedentes de la invención

El adenocarcinoma de colon es una causa principal de mortalidad por cáncer en todo el mundo[1]. El cáncer colorrectal es la tercera causa más común y la segunda causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos[2]. Los adenocarcinomas esporádicos de colon comienzan como adenomas y evolucionan a través de una progresión de cambios moleculares, celulares e histológicos[3]. Aunque los índices de mortalidad durante 5 años han disminuido moderadamente durante las 3 últimas décadas[4], aún se necesita identificar nuevos biomarcadores de pronóstico y dianas terapéuticas para esta enfermedad. Actualmente, la quimioterapia tiene un valor terapéutico significativo aunque la cirugía es la única forma de tratamiento curativo[5].

Las dianas terapéuticas ideales deben asociarse de modo causal con las enfermedades y prestarse a diseñar intervenciones terapéuticas; mientras que los biomarcadores ideales deben ser fáciles de medir y tener fuertes asociaciones con resultados clínicos. Los microARN deben cumplir ambos criterios[6,8].

Los microARN son moléculas de ARN no codificante de 18-25 nucleótidos que regulan la traducción de muchos genes[9]. Desde su descubrimiento[10,11] se ha encontrado que regulan diversos procesos celulares incluyendo la apóptosis[12-14], diferenciación[10,11,15] y proliferación celular[16]. Los microARN también pueden tener una función causal en la carcinogénesis[6,17]. Los niveles de expresión de los microARN están alterados en la mayoría de los tipos de tumores[18,19], incluyendo tumores de colon[19-22]. Los microARN miR-15 y miR-16a están delecionados o regulados negativamente en la mayoría de las leucemias linfocíticas crónicas[23]. La manipulación experimental de microARN específicos modula el desarrollo tumoral en sistemas de modelo de ratón[16,24-26]. El posible pronóstico de los microARN también se ha demostrado en la leucemia linfocítica crónica[7], cáncer de pulmón[8] y neuroblastomas[27].

La expresión aberrante de los microARN puede ser causal para la carcinogénesis, la inhibición de los microARN específicos puede tener implicaciones terapéuticas. Pueden diseñase oligonucleótidos antisentido modificados para inhibir específicamente la función de los microARN[28]. Los antagonistas de los micro-ARN (antagomirs) son un tipo de oligonucleótidos antisentido que han demostrado ser eficaces al inhibir la función de los microARN *in vivo* en ratones[29]. La facilidad para diseñar inhibidores específicos de función microARN los hace candidatos como dianas terapéuticas.

Sumario de la invención

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

En otro aspecto general, en el presente documento se proporciona un método de ensayo para determinar al menos un comienzo de, predisposición a, o reducción del pronóstico de supervivencia para una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon que comprende:

(1) determinar un nivel de expresión de al menos un marcador en una muestra de un sujeto de ensayo; incluyendo el al menos un marcador al menos un producto génico miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR- 181b, miR-203 y combinaciones de los mismos;
(2) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa (1) con un nivel de expresión control del marcador en una muestra de un sujeto sano; y
(3) evaluar si el sujeto padece una enfermedad relacionada con cáncer de colon cuando el resultado de la comparación de la etapa (2) indica que: i) el nivel de expresión del al menos un marcador en el sujeto de ensayo es mayor que el del control o ii), el nivel de expresión del al menos un marcador en el sujeto de ensayo es menor que el del control.

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

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

(1) efectuar la transcripción inversa de ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana;
(2) efectuar la hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana en una micromatriz que comprende un oligonucleótido sonda específico de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y
(3) comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control, en el que una alteración de la señal de al menos un miARN indica si el sujeto padece, está en riesgo de desarrollar, o tiene un pronóstico de supervivencia reducido para, una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

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

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

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

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

En otro aspecto general, en el presente documento se proporciona un método de inhibición de tumorigénesis en un sujeto que padece cáncer de colon, que comprende:

(1) determinar la cantidad de al menos un producto génico miR en células cancerosas del sujeto, con respecto a las células control; y
(2) alterar la cantidad del producto génico miR expresado en las células cancerosas:

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

de tal manera que la tumorigénesis se inhiba en el sujeto.

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

En otro aspecto general, en el presente documento se proporciona un método de identificación de un inhibidor de tumorigénesis que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR asociado con niveles de expresión alterados en una enfermedad relacionada con cáncer de colon, en el que un aumento o una disminución en el nivel de producto génico miR en la célula, con respecto a una célula control adecuada, indica si el agente de ensayo está siendo un inhibidor de tumorigénesis.

En otro aspecto general, en el presente documento se proporciona un método de identificación de un inhibidor de tumorigénesis que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR asociado con un nivel de expresión alterado en una enfermedad relacionada con cáncer de colon, en el que una disminución en el nivel del producto génico miR en la célula, con respecto a una célula control

adecuada, indicativo si el agente de ensayo está siendo un inhibidor de tumorigénesis

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

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

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

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

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

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

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

1) someter a un animal a una terapia cuya eficacia va a evaluarse y
2) determinar el nivel de eficacia del tratamiento que va a evaluarse en el tratamiento o prevención de la enfermedad relacionada con cáncer de colon evaluando al menos un marcador descrito en el presente documento.

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico candidato comprende uno o más de: composiciones farmacéuticas, composiciones nutraceúticas y composiciones homeopáticas. Además, la terapia que va a evaluarse puede ser para su uso en un sujeto humano. En determinadas realizaciones, el método no es un método de tratamiento del organismo del ser humano o del animal por cirugía o terapia.

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

1) medir uno o más marcadores regulados positiva y negativamente descritos en el presente documento después de la exposición del animal a uno o más materiales en cantidades suficientes para iniciar una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon en el animal; y
2) determinar si al menos uno de los marcadores regulados positiva o negativamente tiene la capacidad de iniciar una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon.

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

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

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

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

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

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

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

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

En determinadas realizaciones, todas las etapas del método pueden realizarse *in vitro*.

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

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

En otro aspecto general, en el presente documento se proporciona un método para el tratamiento, la prevención, la inversión o la limitación de la gravedad de una complicación de enfermedad relacionada con cáncer de colon en un individuo que lo necesite, que comprende:

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

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

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

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

En otro aspecto general, en el presente documento se proporciona un medio legible por ordenador que comprende una base de datos que tiene una pluralidad de perfiles de referencia codificados digitalmente, en el que al menos un primer perfil de referencia representa un nivel de al menos un primer marcador en una o más muestras de uno o

más sujetos que presentan un síntoma de una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon, en el que el marcador comprende uno o más productos génicos miR seleccionados del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

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

En otro aspecto general, en el presente documento se proporciona un sistema informatizado para determinar si un sujeto tiene, está predispuesto a tener, o tiene un mal pronóstico para, una enfermedad relacionada con cáncer de colon, que comprende la base de datos descrita en el presente documento, y un servidor que comprende un código ejecutable por ordenador para hacer que el ordenador reciba un perfil de un sujeto, identifique desde la base de datos un perfil de referencia coincidente que, desde el punto de vista diagnostico, sea relevante con el perfil del sujeto y generar una indicación de si el sujeto tiene, o está dispuesto a tener, una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

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

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

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

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

Diversos objetos y ventajas de la presente invención serán obvios para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferida, a la vista de la lectura de los dibujos que se adjuntan.

Breve descripción de los dibujos

La patente o archivo de solicitud contiene al menos un dibujo a color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color serán proporcionadas por la Oficina de patentes tras su solicitud y pago de tasas necesario.

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

(Fig. 1a) La hibridación in situ de miR- 21 se optimizó para diferenciar la alta y baja expresión de miR-21. Las células epiteliales colónicas en tumor humano (T) expresan niveles más altos de miR-21 en comparación con tejido no tumoral (N) adyacente. (Fig. 1c) El núcleo y el citoplasma de las células epiteliales colónicas en tejido tumoral expresa cantidades significativas de miR-21 en tejido tumoral, a alto aumento. (Fig. 1e) Al mismo aumento, el tejido no tumoral muestra expresión no significativa de miR-21.

(Fig. 1b, Fig. 1d, Fig. 1f) La sonda de control mixta muestra tinción no significativa a bajo o alto aumento en secciones en serie de tejido tumoral y no tumoral, según se esperaba. Las barras a escala (Figs. 1c- f) indican que miR- 21 500 μM (g) se expresa a niveles más altos en tumores más avanzados. Los gráficos de puntos representan valores Ct relativos a miR-21 (a partir de RT-PCR cuantitativa) para niveles de expresión de adenoma y tumores que se han normalizado con tejido no-adenoma o no tumoral emparejado, respectivamente. Los tipos de tejidos se han ordenado desde adenoma a tumores de fase I-IV. Las barras indican valores medios. Existe una tendencia significativa a que los tumores más avanzados tengan expresión más alta de miR-21 (ensayo de tendencia no

paramétrico, a través de los grupos ordenados).

Figura 2: miR- 21 se expresa a niveles más altos en tumores más avanzados. Se utilizaron micromatrices microARN para medir niveles de expresión de miR-21. Los gráficos de puntos representan el log_2 de miR-21 (proporciones de tumor/no tumor), calculado a partir de las micromatrices de microARN de la cohorte original. La sonda hsa-miR-21-prec 17 No 1 de la micromatriz se usó para medir la expresión de miR-21. Se excluyeron tejidos con expresión indetectable de miR-21, basándose en los datos de micromatriz. Los tipos de tejidos se han ordenado de tumores de fase I a tumores de fase I-IV según estadificación TNM. Las barras indican valores medios. Existe una tendencia significativa a que los tumores más avanzados tengan expresión más alta de miR-21 ($p = 0,04$; ensayo de tendencia no paramétrico, a través de los grupos ordenados).

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

(Figura 3a) Se utilizaron micromatrices de microARN en la cohorte de ensayo de Maryland para medir los niveles de expresión de microARN de tejidos tumorales y no tumorales. Se excluyeron tejidos con expresión indetectable de miR-21 basándose en los datos de micromatriz. La expresión alta de miR-21 se clasificó basándose en el tercil más alto. Las líneas rojas indican individuos con una alta expresión mientras que las líneas verdes corresponden a baja expresión. En tejido no tumoral, 24/69 tejidos se clasificaron como que tenían expresión alta mientras que 26/72 tumores se clasificaron como que la tenían alta. La expresión alta de miR-21 en tumores (lado derecho) se asoció con mala supervivencia mientras que esta no se asocio en tejido no tumoral.

(Fig. 3b) Validación de la asociación con expresión alta de miR-21 en tumores y mal pronóstico en una cohorte independiente. Los niveles de expresión de miR-21 se midieron por RT-PCR cuantitativa. La expresión alta se basó en el tercil más alto. Se clasificaron 35/103 tejidos no tumorales como que tenían expresión alta y 34/103 tejidos tumorales se clasificaron como que la tenían alta. Los valores P son valores p de rango logarítmico del análisis de Kaplan- Meier. Las X en todas las líneas indican el tiempo al cual se censuraba a un individuo.

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

(Fig. 4a) Se utilizaron micromatrices microARN en la cohorte de ensayo de Maryland para medir los niveles de expresión de microARN de tejidos tumorales y no tumorales. Se excluyeron tejidos con expresión indetectable de miR-21 basándose en los datos de micromatriz. La expresión alta de miR-21 se clasificó basándose en el tercil más alto. Las líneas rojas indican individuos con alta expresión mientras que las líneas verdes corresponden a baja expresión. En tejido no tumoral, 26/74 tejidos se clasificaron como que tenían expresión alta mientras que 28/79 tumores se clasificaron como que la tenían alta. La expresión alta de miR-21 en tumores (lado derecho) se asoció con mala supervivencia mientras que esta no se asoció en tejido no tumoral.

(Fig. 4b) Validación de la asociación con expresión alta de miR-21 en tumores y mal pronóstico en una cohorte independiente. Los niveles de expresión de miR-21 se midieron por RT-PCR cuantitativa. La expresión alta se basó en el tercil más alto. Se clasificaron 37/111 tejidos no tumorales como que tenían expresión alta y 37/111 tejidos tumorales se clasificaron como que la tenían alta. Todos los valores p son valores p de rango logarítmico del análisis de Kaplan- Meier. Las X de todas las líneas indican el tiempo al cual se censuraba a un individuo.

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

(Fig. 5a) Comparación de tasas de supervivencia de sujetos en fase II/III según la TNM con histología de adenocarcinoma convencional por niveles de expresión de miR-21 y recepción de quimioterapia adyuvante. Para los 77 sujetos en fase II/III, 25 se clasificaron como receptores de terapia con expresión baja de miR-21, 28 como con expresión baja de miR-21 y no receptores de terapia, 11 como receptores de terapia con expresión alta de miR-21 y 13 como con expresión alta de miR-21 y no receptores de terapia. Para los sujetos de fase II/III que recibieron quimioterapia adyuvante, la expresión alta de miR-21 en tumores se asoció con mala supervivencia ($p = 0,03$).

(Fig. 5b) Comparación de sujetos en fase II según la TNM con histología de adenocarcinoma convencional. Para los 33 sujetos de fase II, 8 se clasificaron como receptores de terapia con expresión baja de miR-21, 15 como con expresión baja de miR-21 y no receptores de terapia, 3 como receptores de terapia con expresión alta de miR-21 y 7 como con expresión alta de miR-21 alta y no receptores de terapia. Todos los sujetos en fase II que recibieron quimioterapia sobrevivieron durante todo el estudio.

(Fig. 5c) Comparación de sujetos en fase III según la TNM con histología de adenocarcinoma convencional. Para los 44 sujetos en fase III, 17 se clasificaron como receptores de terapia con expresión baja de miR-21, 13 como con expresión baja de miR-21 y no receptores de terapia, 8 como receptores de terapia con expresión alta de miR-21 y

6 como con expresión alta de miR-21 y no receptores de terapia. Para los sujetos en fase II que recibieron quimioterapia adyuvante, la expresión alta de miR-21 en tumores se asoció con una mala supervivencia (p = 0,02). Las X en todas las líneas indican el tiempo al cual se censuró a un individuo.

Figuras 6a, 6b y 6c: Análisis combinado de la cohorte de ensayo de Maryland y la cohorte de validación de Hong Kong que examina asociaciones entre la expresión de miR-21 en tumores y recepción de quimioterapia adyuvante con pronóstico. Este análisis incluye a todos los sujetos en fase II/III según la TNM de ambas cohortes. Se excluyó a los individuos con histología de adenocarcinoma mucinoso o carcinoma adenoescamoso. La columna izquierda incluye representaciones gráficas de Kaplan-Meier que analizan la asociación entre la recepción de terapia adyuvante y el pronóstico. La columna central incluye un análisis de la asociación entre la expresión alta de miR-21 en tumores y el pronóstico y la columna de la derecha subdivide a los individuos basándose en quimioterapia y en el estado de expresión de miR-21.

(Fig. 6a) Todos los sujetos en fase II/III según la TNM. Para los 119 sujetos en fase II/III, 40 se clasificaron como receptores de terapia con expresión baja de miR-21, 41 como con expresión baja de miR-21 y no receptores de terapia, 16 como receptores de terapia con expresión alta de miR-21 y 22 como con expresión alta de miR-21 y no receptores de terapia. La expresión alta de miR-21 se asoció con una mala supervivencia en aquellos sujetos que recibieron quimioterapia (p = 0,003), así como en aquellos que no recibieron terapia (p = 0,04).

(Fig. 6b) Todos los sujetos en fase II según la TNM. Para los 52 sujetos en fase II/III, 10 se clasificaron como receptores de terapia con expresión baja de miR-21, 25 como con expresión baja de miR-21 y no receptores de terapia, 4 como receptores de terapia con expresión alta de miR-21 y 13 como con expresión alta de miR-21 y no receptores de terapia. La asociación entre la expresión alta de miR-21 y el pronóstico no fue estadísticamente significativa en individuos que recibieron quimioterapia (p = 0,11) o en los que no recibieron quimioterapia (p = 0,06).

(Fig. 6c) Todos los sujetos en fase III según la TNM. Para los 67 sujetos en fase III, 30 se clasificaron como receptores de terapia con expresión baja de miR-21, 16 como con expresión baja de miR-21 y no receptores de terapia, 12 como receptores de terapia con expresión alta de miR-21 y 9 como con expresión alta de miR-21 y no receptores de terapia. La expresión alta de miR-21 se asoció significativamente como mala supervivencia en sujetos en fase III que recibieron quimioterapia (p = 0,007), pero en sujetos que no recibieron quimioterapia (p = 0,30). Las X de todas las líneas indican el tiempo al cual se censuró a un individuo.

Figuras 7a - 7c. Los perfiles globales de miARN están asociados con la estadificación TNM clínica y un mal pronóstico. El agrupamiento jerárquico de las proporciones tumorales/no tumorales (TIN) del miARN dio como resultado la formación de dos grupos denominados arbitrariamente grupo A y grupo B. El mapa HEAT resultante y las asignaciones de grupos se muestran en la Figura 7a. Estos dos grupos estaban formados por individuos con pronósticos de supervivencia significativamente diferentes para la estadificación de TNM, diagnosticándose al grupo de individuos B más probablemente como en cualquiera de las fases III o IV en comparación con el grupo de individuos A (Fig. 7b). El análisis de Kaplan-Meier muestra que los individuos del Grupo B también tienen un peor pronóstico de supervivencia (Fig. 7c).

Figuras 8a - 8i. Las proporciones T/Nde los miARN individuales predicen pronósticos de supervivencia. En estas figuras se presentan gráficos que muestran proporciones T/Npor estadificación TNM (izquierda) y análisis Kaplan-Meier (derecha) para cada uno de estos 9 miARN. El eje Y (proporción T/N mediante gráficos de estadificación TNM) indica la proporción T/N transformada a log(2) de cada individuo mientras que el eje X agrupa a los individuos por estadificación TNM (I, II, III o IV). Los valores de significancia mostrados son el resultado de un ensayo de tendencia no paramétrico de valores de proporción T/N promedio a través de los individuos agrupados por estadificación. Las representaciones de Kaplan-Meier incluyen a todos los individuos con datos de proporciones T/N para este miARN particular. Se encontró que las proporciones T/N se asociaban tanto con estadificación clínica como con pronóstico de supervivencia.

Figuras 9a y 9b. Una firma de miARN de los 9 miARN predice riesgo de muerte por cáncer de colon. Cada una de las proporciones T/N de los miR- 21, miR-106a, miR181b, miR-16b, miR-203, let-7g, miR-29a, miR-103-2 y miR-10a mostró ser predictiva de pronóstico de cáncer de colon. El agrupamiento jerárquico de las proporciones T/N de estos 9 miARN dio como resultado la división de los individuos en dos grupos (1A) con pronósticos de supervivencia significativamente diferentes (1B). Los individuos del grupo B tenían un riesgo significativamente más alto de morir por cáncer de colon que los del grupo A. En este análisis, se excluyó a los individuos que presentaban una desaparición mayor de 2 de las 9 proporciones T/N que constituían la firma miARN.

Descripción detallada de la realización preferida

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

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

La molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos puede obtenerse a partir del precursor miR a través de vías de procesamiento natural (por ejemplo, usando células intactas o lisados celulares) o por vías de procesamiento sintético (por ejemplo, usando enzimas de procesamiento aisladas, tales como Dicer, Argonaut o ARNasa III aisladas). Se entiende que la molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos también puede producirse directamente mediante síntesis biológica o química, sin tener que procesarse a partir del precursor miR. Cuando en el presente documento se hace referencia al nombre microARN, el nombre se corresponde con las formas tanto precursora como madura, a menos que se indique de otra manera.

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

En una realización, el al menos un producto génico miR medido en la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-160a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos. En una realización particular, el producto génico miR es miR-21.

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

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

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

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

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

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

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

tisular de un sujeto es menor que la cantidad producida a partir del mismo gen en una muestra tisular o celular control.

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

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

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

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

Las sondas pueden marcarse para elevar la actividad específica por cualquier método de traducción de corte enzimático de Rigby et al. (1977), J. Mol. Biol. 113: 237-251 o por el método de cebado al azar de Fienberg et al. (1983), Anal. Biochem. 132: 6-13. Este último método es el método de elección para sintetizar sondas de alta de actividad específica marcadas con ^{32}P a partir de ADN monocatenario o de moldes de ARN. Por ejemplo, reemplazando nucleótidos preexistentes con nucleótidos altamente radiactivos de acuerdo con el método de traducción de corte enzimático, es posible preparar sondas de ácido nucleico marcadas con ^{32}P con una buena actividad específica superior a 10^{8} rpm/microgramos. Después, puede realizarse detección de hibridación por autorradiografía exponiendo filtros hibridados a películas fotográficas. La exploración densitométrica de las películas fotográficas expuestas a los filtros hibridados proporciona una medición exacta de niveles de transcriptos génicos miR. Usando otra estrategia, pueden cuantificarse niveles de transcriptos génicos miR mediante sistemas de formación de imágenes informatizados, tal como el Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager disponible en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

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

Además de las técnicas de Northern y otras técnicas de hibridación de ARN, la determinación de los niveles de transcritos de ARN puede realizarse usando la técnica de hibridación *in situ.* Esta técnica requiere menos células que la técnica de transferencia de Northern, e implica depositar células enteras en un portaobjetos al microscopio y explorar el contenido de ácido nucleico de la célula con una solución que contenga sondas de ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ARN) radioactivo o marcado de otra manera. Esta técnica es particularmente muy adecuada para analizar muestras de biopsia tisular de sujetos. La realización práctica de la técnica de hibridación *in situ* se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos Nº 5.427.916.

En un ejemplo no limitante, las sondas que son adecuadas para realizar la hibridación *in situ* de un producto génico miR determinado puede producirse a partir de las secuencias de ácido nucleico, e incluyen, pero sin limitación, sondas que tiene una complementariedad de al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %,

98 %, 99 % o una complementariedad completa con un producto génico miR de interés, como se ha descrito anteriormente.

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

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

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

Como se usa en el presente documento, “oligonucleótido sonda” u “oligodesoxinucleótido sonda” se refiere a un oligonucleótido que puede hibridarse con un oligonucleótido diana. El “oligonucleótido diana” u “oligodesoxinucleótido diana” se refiere a una molécula a detectar (por ejemplo, mediante hibridación). Las expresiones “oligonucleótido sonda específico de miR” u “oligonucleótido sonda específico para un miR” significan un oligonucleótido sonda que tiene una secuencia seleccionada para hibridarse con un producto génico miR específico o con un trascrito inverso del producto génico miR específico.

Un “perfil de expresión” o “perfil de hibridación” de una muestra particular es esencialmente una identificación genética del estado de la muestra; aunque dos estados pueden tener cualquier similitud genética particular expresada, la evaluación de diversos genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión génico que es exclusivo del estado de la célula. Es decir, puede diferenciarse tejido normal de tejido canceroso (por ejemplo, tumoral), y dentro del tejido canceroso, pueden determinarse diferentes estados de pronóstico (por ejemplo, perspectivas de supervivencia, buena o mala, a largo plazo). Comparando los perfiles de expresión del tejido de cáncer de colon en diferentes estados, se obtiene información con respecto a que genes son importantes (incluyendo regulación positiva y negativa de genes) en cada uno de estos estados. La identificación de secuencias que se expresan diferencialmente en tejido de cáncer de colon, así como la expresión diferencial resultante en diferentes resultados de pronóstico, permite el uso de esta información de diversas maneras.

En un ejemplo no limitante, puede evaluarse un régimen de tratamiento particular (por ejemplo, para determinar si un fármaco quimioterapéutico actúa mejorando el pronóstico a largo plazo en un paciente particular). De manera similar, pueden realizarse o confirmarse diagnósticos comparando muestras de pacientes con perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión génica (o genes individuales) permiten explorar candidatos farmacológicos que supriman el perfil de expresión de cáncer de colon o trasformen un perfil de mal pronóstico en un perfil de mejor pronóstico.

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

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

La micromatriz puede prepararse a partir de sondas de oligonucleótidos específicas de genes generados a partir de secuencias de miARN conocidas. La matriz puede contener dos sondas de oligonucleótidos diferentes para cada miARN, una que contenga la secuencia madura activa y la otra siendo específica para el precursor del miARN. La matriz también puede contener controles, tales como una o más secuencias de ratón que se diferencian de los ortólogos humanos solo en algunas bases, que pueden actuar como controles en condiciones de hibridación rigurosas. Los ARNt u otros ARN (por ejemplo ARNr, los ARNm) de ambas especies también pueden imprimirse sobre la microplaca, proporcionando un control interno, positivo, relativamente estable para la hibridación específica. También pueden incluirse en la microplaca uno o más controles apropiados para la hibridación no específica. Para esta finalidad, se seleccionan secuencias basándose en la ausencia de cualquier homología con cualquiera de los miARN conocidos.

La micromatriz puede fabricarse usando técnicas conocidas en el campo técnico. Por ejemplo, los oligonucleótidos sonda de una longitud apropiada, por ejemplo, 40 nucleótidos, están modificados en 5' en la posición C6 e impresos usando sistemas de micromatriz a la venta en el mercado, por ejemplo, los portaobjetos 100 Microarrayer de GeneMachine OmniGrid™ y Amersham CodeLink™ activados. El oligómero de ADNc marcado correspondiente a los ARN diana se preparan realizando la transcripción inversa del ARN diana con un cebador marcado. Después de la síntesis de la primera cadena, los híbridos de ARN/ADN se desnaturalizan para degradar los moldes de ARN. Los ADNc diana marcados preparados de esta manera se hibridan después en la microplaca de micromatriz en condiciones de hibridación rigurosas, por ejemplo, 6X SSPE/ formamida al 30 % a 25 ºC durante 18 horas, seguido de lavado en 0,75X TNT (Tris HCl/NaCl/Tween 20) a 37 ºC durante 40 minutos. La hibridación se produce en posiciones sobre la matriz en las que el ADN sonda inmovilizado reconoce un ADNc diana complementario en la muestra. El ADNc diana marcado marca la posición exacta sobre la matriz en la que se produce la unión, lo que permite realizar automáticamente la detección y la cuantificación. El resultado consiste en un listado de acontecimientos de hibridación que indican la abundancia relativa de secuencias de ADNc específicas y por lo tanto la abundancia relativa de los miR complementarios correspondientes en la muestra del paciente.

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

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

Además del uso para ensayos de nivel de expresión cuantitativa de los miR específicos, una microplaca que contiene oligonucleótidos sonda específicos de miARN correspondientes a una parte sustancial del miRNoma, preferentemente puede emplearse todo el miRNoma para realizar el perfil de expresión del gen miR, para análisis de modelos de expresión miR. Distintas firmas miR pueden asociarse con marcadores de enfermedades establecidas, o directamente con una patología.

De acuerdo con los métodos de realización de perfiles de expresión descritos en el presente documento, se realiza de manera cuantitativa la transcripción inversa del ARN total de una muestra de un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana marcados complementarios al ARN en la muestra. Los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan después en una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra. El resultado es un perfil de hibridación para la muestra que representa el modelo de expresión del miARN en la muestra. El perfil de hibridación comprende la señal de la unión de los oligodesoxinucleótidos diana de la muestra con los oligonucleótidos sonda específicos de miARN en la micromatriz. El perfil puede registrarse como la presencia o ausencia de unión (señal frente a señal cero).

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

Dentro de la experiencia en la técnica también hay otras técnicas para medir la expresión génica miR e incluyen diversas técnicas para medir tasas de transcripción y degradación de ARN.

En el presente documento también se proporcionan métodos para determinar el pronóstico de un sujeto con un

cáncer de colon, que comprende medir el nivel de al menos un producto génico miR, que está asociado con un pronóstico particular en una enfermedad relacionada con cáncer de colon (por ejemplo, un pronóstico bueno o positivo, un pronóstico malo o adverso), en una muestra de ensayo del sujeto.

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

Sin el deseo de limitarse a ninguna teoría, se cree que las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos miR en las células pueden dar como resultado la desregulación de una o más dianas deseadas para estos miR, lo que puede conducir a la formación de cánceres sólidos. Por lo tanto, alterando el nivel del producto génico miR (por ejemplo, disminuyendo el nivel de un producto génico miR que está regulado positivamente en células cancerosas sólidas, aumentando el nivel de un producto génico miR que está regulado negativamente en células cancerosas sólidas) puede tratarse satisfactoriamente el cáncer sólido.

Por consiguiente, adicionalmente en el presente documento se proporcionan métodos de inhibición de tumorigénesis en un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, un cáncer sólido en el que al menos un producto génico miR está desregulado (por ejemplo, regulado negativamente, regulado positivamente) en las células cancerosas del sujeto. Cuando el al menos un producto génico miR aislado está regulado negativamente en las células cancerosas (por ejemplo, miR-21), el método comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un producto génico miR aislado, o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo de los mismos, de tal manera que se inhiba la proliferación de las células cancerosas en el sujeto.

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

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

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

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

Un compuesto inhibidor de expresión del gen miR puede administrarse a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos anticancerosos adicionales. Como tratamientos anticancerosos adecuados se incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia y sus combinaciones (por ejemplo, quimiorradiación).

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

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

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

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

Un experto en la técnica también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para la determinación de un producto génico miR aislado a un sujeto determinado. Por ejemplo, un producto génico miR puede administrarse al sujeto una vez (por ejemplo, como una sola inyección o deposición). Como alternativa, un producto génico miR puede administrarse una vez o dos veces al día a un sujeto durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veinticuatro días, más particularmente de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación particular, un producto génico miR se administra una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende administraciones múltiples, se entiende que la cantidad eficaz del producto génico miR administrada al sujeto puede comprender la cantidad total del producto génico administrada durante todo el régimen de dosificación.

Como se usa en el presente documento, un producto génico miR “aislado” es uno que se sintetiza, o se altera o se extrae del estado natural mediante intervención humana. Por ejemplo, un producto génico miR sintético, o un producto génico miR parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural, se considera que está "aislado". Un producto génico miR aislado puede existir en forma sustancialmente pura, o puede existir en una célula en la que se ha administrado el producto génico miR. Por tanto, un producto génico miR que se administra deliberadamente a, o se expresa en, una célula se considera un producto génico miR "aislado". Un producto génico miR producido dentro de una célula a partir de una molécula precursora miR también se considera que es una molécula "aislada". De acuerdo con una realización particular, los productos génicos miR aislados descritos en el presente documento pueden usarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer sólido en un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

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

Como alternativa, los productos génicos miR pueden expresarse a partir de plásmidos de ADN circular o lineal

recombinante usando cualquier promotor adecuado. Como promotores adecuados para expresar ARN a partir de un plásmido se incluyen, por ejemplo las secuencias promotoras de U6 o de H1 ARN pol III, o los promotores de citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está incluida en la especialidad en la técnica. Los plásmidos recombinantes también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos miR en células cancerosas.

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

Los productos génicos miR pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante distinto, o pueden expresarse a partir del mismo plásmido recombinante. En una realización, los productos génicos miR se expresan como moléculas precursoras de ARN a partir de un solo plásmido, y las moléculas precursoras se procesan en el producto génico miR funcional mediante un sistema de procesamiento adecuado, incluyendo, pero sin limitación, sistemas de procesamiento existentes dentro de una célula cancerosa. Otros sistemas de procesamiento adecuados incluyen, por ejemplo, el sistema de lisado celular de *Drosophila in vitro* (como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada Nº 2002/0086356 de Tuschl et al.,) y el sistema RNAsa III de *E. coli* (como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada Nº 2004/0014113 de Yang et al.,).

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

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

Los productos génicos miR también pueden expresarse a partir de vectores virales recombinantes. Se contempla que los productos génicos miR pueden expresarse a partir de dos vectores virales recombinantes distintos, o a partir del mismo vector viral. El ARN expresado a partir de los vectores virales recombinantes puede aislarse de sistemas de expresión celular cultivados mediante técnicas convencionales, o puede expresarse directamente en células cancerosas. El uso de vectores virales recombinantes para administrar a los productos génicos miR a células cancerosas se comenta más adelante con más detalle.

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

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

Por ejemplo, pueden pseudotipificarse vectores lentivirales con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VEV), virus de la rabia, Ébola, Mokola y similares. Pueden fabricarse vectores de AAV para dirigirse células diferentes modificando genéticamente los vectores para expresar serotipos de proteínas capsidiales diferentes. Por ejemplo, un vector de AAV que expresa una cápside de serotipo 2 en un genoma de serotipo 2 se denomina AAV 2/2. Este gen capsidial de serotipo 2 en el vector AAV 2/2 puede reemplazarse por un gen capsidial de serotipo 5 para producir un vector AAV 2/5. Las técnicas para construir vectores de AAV que expresen diferentes serotipos de proteínas capsidiales se encuentran dentro de la habilidad en la técnica; véase, por ejemplo Rabinowitz, J. E., et al. (2002), J. Virol. 76: 791-801.

La selección de vectores virales recombinantes, métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar ARN en el vector, métodos para administrar el vector viral a las células de interés y recuperar los productos de ARN expresados se encuentran dentro de habilidad en la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg (1995), Gene Therapy 2:

301-310; Eglitis (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller (1990), Hum. Gene Therapy 1: 5-14; y Anderson (1998), Nature 392: 25-30.

Los vectores virales adecuados particularmente son aquellos derivados de AV y AAV. Un vector de AV adecuado para expresar los productos génicos miR, un método para construir el vector AV recombinante y un método para administrar el vector en células diana, se describen en Xia et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010. Los vectores de AAV adecuados para expresar los productos génicos miR, métodos para construir el vector AAV recombinante y métodos para administrar a los vectores en células diana se describen en Samulski et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher et al. (1996), J. Virol., 70: 520-532; Samulski et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; Patente de Estados Unidos Nº 5.252.479; Patente de Estados Unidos Nº 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional Nº WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional Nº WO 93/24641. En una realización, los productos génicos miR se expresan a partir de un solo vector AAV recombinante que comprende el promotor temprano intermedio del CMV.

En una realización determinada, un vector viral AAV recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN precursor de miR unido operativamente a una secuencia de terminación poliT bajo el control de un promotor de ARN U6 humano. Como se usa en el presente documento, “unido operativamente a una secuencia de terminación poliT” significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas en sentido o antisentido están inmediatamente adyacentes a la señal de terminación poliT en la dirección 5’. Durante la transcripción de las secuencias miR a partir del vector, las señales de terminación poliT actúan para terminar la transcripción.

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

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

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

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico en un ARNip que es “sustancialmente

idéntica" a una secuencia diana contenida dentro del ARNm diana es una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia diana, o que difiere de la secuencia diana en uno o dos nucleótidos. Las cadenas en sentido y antisentido del ARNip pueden comprender dos moléculas de ARN monocatenarias, complementarias, o pueden comprender una sola molécula en la que dos partes complementarias tienen bases emparejadas y están unidas covalentemente por una zona en "horquilla" monocatenaria.

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

Una o las dos cadenas del ARNip también puede comprender un saliente en posición 3'. Como se usa en el presente documento, un "saliente en posición 3'" se refiere a al menos un nucleótido no emparejado que se extiende desde el extremo 3' de una cadena de ARN que forma un dúplex. Por tanto, en determinadas realizaciones, el ARNip comprende al menos un saliente en posición 3' de 1 a 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) de longitud, de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En una realización particular, el saliente en posición 3' está presente en ambas cadenas del ARNip y tiene una longitud de 2 nucleótidos. Por ejemplo, cada cadena del ARNip puede comprender salientes en posición 3' de ácido ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

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

La expresión de un gen miR determinado también puede inhibirse mediante un ácido nucleico antisentido. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une al ARN diana mediante interacciones de tipo ARN-ARN, ARN-ADN o ARN-ácido nucleico peptídico, que alteran la actividad del ARN diana. Los ácidos nucleicos antisentido adecuados para su uso en los métodos de la presente invención son ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ARN, ADN, quimeras de ARN-ADN, ácido nucleico peptídico (ANP)) que generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico complementaria a una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico miR. El ácido nucleico antisentido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos una complementariedad del 50-100 %, 75-100 % o 95-100 % con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico miR.

Sin el deseo de limitarse a ninguna teoría, se cree que los ácidos nucleico antisentido activan la RNasa H u otra nucleasa celular que digiere dúplex producto génico miR/ácido nucleico antisentido.

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

Los ácidos nucleicos antisentido pueden producirse química o biológicamente, o pueden expresarse a partir de un vector plasmídico o viral recombinante, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos miR aislados. Los métodos ejemplares de producción y ensayo se incluyen en la experiencia en la técnica; véase, por ejemplo, Stein y Cheng (1993), Science 261: 1004 y en la Patente de Estados Unidos Nº 5.849.902 de Woolf et al.

Un ácido nucleico enzimático también puede inhibir la expresión de un gen miR determinado. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico enzimático" se refiere a un ácido nucleico que comprende una región de unión a sustrato que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico contigua de un producto génico miR, y que puede escindir específicamente el producto génico miR. La región de unión a sustrato del ácido nucleico enzimático puede tener una complementariedad de, por ejemplo, el 50-100 %, 75-100 % o 95-100 %, con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico miR. Los ácidos nucleicos enzimáticos también pueden comprender modificaciones en los grupos base, glucídicos y/o fosfato. Un ácido nucleico enzimático ejemplar para su uso en los métodos de la presente invención es una ribozima.

Los ácidos nucleicos enzimáticos pueden producirse química o biológicamente, o pueden expresarse a partir de un vector plasmídico o viral recombinante, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos miR aislados. Métodos ejemplares para producir y evaluar moléculas de ARNbc o de ARNip se describen en Werner y Uhlenbeck (1995), Nucl. Acids Res. 23: 2092-96; Hammann et al. (1999), Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 9: 25-31; y en la Patente de Estados Unidos Nº 4.987.071 de Cech et al,.

La administración de al menos un producto génico miR, o al menos un compuesto para inhibir la expresión de miR, inhibirá la proliferación de célula cancerosas en un sujeto que tiene un cáncer sólido. Como se usa en el presente documento, “inhibir la proliferación de una célula cancerosa” significa destruir la célula, o detener de manera permanente o temporal o reducir el crecimiento de la célula. La inhibición de la proliferación de células cancerosas puede interferir si el número de dichas células en el sujeto permanece constante o disminuye después de la administración de los productos génicos miR o los compuestos que inhiben la expresión génica miR. Una inhibición de la proliferación de células cancerosas también puede interferir si el número absoluto de dichas células aumenta, aunque disminuya la tasa de crecimiento tumoral.

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

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

Los productos génicos miR o los compuestos de inhibición de expresión del gen miR pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier medio adecuado para administrar estos compuestos a células cancerosas del sujeto. Por ejemplo, los productos génicos miR o los compuestos de inhibición de expresión de miR pueden administrarse por métodos adecuados para transfectar células del sujeto con estos compuestos, o con ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican estos compuestos.

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

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

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

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

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

Los vectores plasmídicos y virales recombinantes que comprenden secuencias que expresan los productos génicos miR o los compuestos de inhibición de expresión del gen miR, y técnicas para administrar dichos plásmidos y vectores a células cancerosas, se describen en el presente documento y/o son bien conocidos en la técnica.

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

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

Los liposomas para su uso en los métodos de la presente invención también pueden modificarse para impedir la eliminación por el sistema macrófago mononuclear ("SMM") y sistema retículoendotelial ("SRE"). Dichos liposomas modificados tienen restos que inhiben la opsonización en la superficie o están incorporados en la estructura del liposoma. En una realización particularmente preferida, un liposoma puede comprender un resto de inhibición de opsonización y un ligando.

Los restos que inhiben la opsonización, que son adecuados para su uso en la preparación de liposomas, son normalmente polímeros hidrófilos grandes que están unidos a la membrana de los liposomas. Como se usa en el presente documento, un resto que inhibe la opsonización está "unido" a una membrana del liposoma cuando está química o físicamente unido a la membrana, por ejemplo, mediante el intercalado de un anclaje liposoluble en la propia membrana, o mediante unión directamente a grupos activos de lípidos de membrana. Estos polímeros hidrófilos que inhiben la opsonización forman una capa protectora superficial que disminuye significativamente la captación de los liposomas por el SMM y SRE; como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 4.920.016.

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

El resto que inhibe la opsonización puede unirse a la membrana del liposoma mediante cualquiera de las numerosas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster de N-hidrosuccinimida de PEG puede unirse a un anclaje liposoluble de fosfatidil-etanolamina y después unirse a una membrana. De manera similar, un polímero de dextrano puede derivatizarse con un anclaje liposoluble de este estearilamina mediante aminación reductora usando $Na(CN)BH_3$ y una mezcla de disolvente, tal como tetrahidrofurano y agua en una proporción de 30:12 a 60 ºC.

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

Los productos génicos miR o compuestos que inhiben la expresión del gen miR pueden formularse como composiciones farmacéuticas, algunas veces denominadas "medicamentos", antes de administrarlas a un sujeto, de

acuerdo con las técnicas conocidas en la materia. Por consiguiente, también se describen composiciones farmacéuticas para el tratamiento de un cáncer sólido. En una realización, la composición farmacéutica comprende al menos un producto génico miR aislado, o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el al menos un producto génico miR se corresponde con un producto génico miR que tiene un nivel de expresión disminuido en células de cáncer sólido con respecto a células control adecuadas. En determinadas realizaciones el producto génico miR aislado se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

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

Las composiciones farmacéuticas se caracterizan por ser al menos estériles y apirógenas. Como se usa en el presente documento, las “composiciones farmacéuticas” incluyen formulaciones para uso humano y veterinario. Los métodos para preparar composiciones farmacéuticas se encuentren dentro de la habilidad en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden al menos un producto génico miR o compuesto que inhibe la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifica) (por ejemplo, del 0,1 al 90 % en peso), o una sal fisiológicamente aceptable de los mismos, mezclado con un transportador farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden adicionalmente uno o más agentes anticancerosos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos). Las formulaciones farmacéuticas también pueden comprender al menos un producto génico miR o compuesto que inhibe la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifica), que están encapsulados en liposomas y un transportador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende un gen, o producto génico, miR que es miR-21.

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

En una realización particular, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico miR o un compuesto que inhibe la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifica) que es resistente a degradación por nucleasas. Un experto en la técnica puede sintetizar fácilmente ácidos nucleicos que son resistentes a nucleasas, por ejemplo, incorporando uno o más ribonucleótidos que están modificados en la posición 2’ en el producto génico miR. Como ribonucleótidos adecuados, modificados en posición 2’, se incluyen los modificados en la posición 2’ con flúor, amino, alquilo, alcoxi y O-alilo.

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

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

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

Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más agentes anticancerosos. En una

realización particular, las composiciones comprenden al menos uno producto génico miR o un compuesto que inhibe la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprenda secuencias que los codifique) y al menos una agente quimoterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que son adecuados para los métodos incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes de ADN, agentes antibióticos antitumorales, agentes antimetabólicos, agentes estabilizadores de tubulina, agentes desestabilizadores de tubulina, agentes antagonistas de hormonas, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de proteína quinasa, inhibidores de HMG-CoA, inhibidores de CDK, inhibidores de ciclina, inhibidores de caspasa, inhibidores de metaloproteinasa, ácidos nucleico antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ácidos nucleicos y agentes virales, bacterianos y exotóxicos modificados molecularmente. Como ejemplos de agentes adecuados para las composiciones de la presente invención se incluyen, pero sin limitación, citidín arabinósido, metotrexato, vincristina, etopóxido (VP- 16), doxorrubicina (adriamicina), cisplatino (CDDP), dexametasona, arglabina, ciclofosfamida, sarcolisina, metilnitrosourea, fluorouracilo, 5-fluorouracilo (5FU), vinblastina, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, oxaliplatino, irinotecán, topotecán, leucovorina, carmustina, estreptozocina, CPT- 11, taxol, tamoxifeno, dacarbacina, rituximab, daunorrubicina, 1-β-D-arabinofuranosilcitosina, imatinib, fludarabina, docetaxel, FOLFOX4.

En el presente documento también se proporcionan métodos de identificación de un inhibir de tumorigénesis, que comprenden proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR en la célula. En una realización, el método comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR asociado con niveles de expresión disminuidos en células cancerosas. Un aumento en el nivel del producto génico miR en la célula, después de proporcionar el agente, con respecto a una célula control adecuada (por ejemplo, no se proporciona el agente), indica que el agente de ensayo es un inhibidor de tumorigénesis. En una realización particular, al menos un producto génico miR, asociado con niveles de expresión disminuidos en células cancerosas, se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

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

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

A continuación la invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Los patrones de expresión de microARN están alterados en tumores de colon

Se compararon perfiles de microARN de 84 pares de tejidos de colon tumorales y no tumorales adyacentes usando micromatrices de microARN[30]. Estos 84 sujetos eran pacientes pertenecientes al área metropolitana de Baltimore, Maryland, con adenocarcinoma incidente de colon, y a los que se hace referencia como la cohorte de ensayo de Maryland (**Tabla 1**).

Tabla 1 – características de Población y Tumores

	Cohorte de Ensayo de Maryland	Cohorte de Validación de Hong Kong
	N=84	N=113
Área a la que pertenecen	Baltimore, Maryland, Estados Unidos	Hong Kong, China
Edad en el momento de la incorporación-en años Media ± DT	64,6 ± 10,7	55,8 ± 15

Intervalo	32-87	32-84
Sexo – nº (%)		
Hombre	66 (79)	56 (50)
Mujer	18 (21)	57(50)
Raza – nº (%)		
Blanca	52 (62)	0 (0)
Negra	32 (38)	0(0)
Asiática	0 (0)	113 (100)
Localización del tumor – nº (%)		
Distal	48 (59)	90 (80)
Proximal	34 (41)	23 (20)
Histología del Adenocarcinoma- nº, (%)		
Adenocarcinoma	75 (89)	105 (93)
Adenocarcinoma mucinoso	8 (10)	7 (6)
Carcinoma adenoescamoso	1 (1)	0 (0)
Células en anillo de sello y mucinosas	0 (0)	1 (1)
Quimioterapia adyuvante[2] – nº (%)	22(37)	40 (35)
Recibida		
No recibida	37 (63)	73 (65)
Fase TNM – nº (%)		
II	29 (34)	37 (33)
III	36 (43)	48 (42)
IV	10 (12)	19(17)

[1]Distal incluye tumores localizados en, o distales al, colon descendiente. Los tumores proximales incluyen tumores en, o proximales a la flexión esplénica. Se disponía de localización tumoral de 82 sujetos en la cohorte original y de todos los sujetos en la cohorte de validación. [2]Se disponía de información detallada correspondiente a receptores de quimioterapia de 59 sujetos en la cohorte de ensayo y en todos los sujetos en la cohorte de validación. La quimioterapia se basaba principalmente en fluorouracilo (en forma de fármacos orales o intravenosos de 5-fluorouracilo, incluyendo tegafur con uracilo [UFT]) con o sin Levamisol o Leucovorina).

Los perfiles de microARN tumorales eran claramente diferentes en comparación con los perfiles no tumorales. Se encontraron treinta y siete microARN independientes que se expresaban diferencialmente en tumores ($p<0,001$ con una Tasa de Descubrimientos Falsos (TDF) < 0,5 %; **Tabla 2**

Tabla 2 - Los microARN se Expresan Diferencialmente en Tumores

Sonda	miR maduro	Valor p[1]	TDF[2]	Factor de Cambio	Localización cromosómica
hsa-mir-21No1	miR-21	< 1e-07	< 1e-07	1,7	17q23.2
hsa-mir-021-prec-17No1	miR-21	< 1e-07	<1e-07	1,8	17q23.2

hsa-mir-092-prec-13=092-1No2	miR-92	< 1e-07	< 1e-07	1,4	13g31.3
hsa-mir-222- precNo2	miR-222	1.40E-06	8.05B-05	1,2	Xp11.3
hsa-mir-181b-2No1	miR-181b	1.90E-06	8.74E-05	1,2	9q33.3
has-mir-210-prec	miR-210	1.12E-05	0,00032	1,2	11p15.5
hsa-mir-020-prec	miR-20a	2.53E-05	0,00057	1,5	13q31.3
hsa-mir-106-prec-X	miR-106a	3.30E-05	0,00058	1,4	X26.2
hsa-mir-106aNo1	miR-106a	3.51E-05	0,00058	1,4	X26.2
hsa-mir-093-prec-7.1=093-1	miR-93	3.52E-05	0,00058	1,2	7q22.1
hsa-mir-335No2	miR-335	3.55E-05	0,00058	1,2	7q32.2
hsa-mir-222- precNo1	miR-222	4.27E-05	0,00065	1,2	Xp11.3
hsa-mir-338No1	miR-338	5.78E-05	0,00074	1,1	17q25,3
hsa-mir-133bNo2	miR-133b	6.50E-05	0,00079	1,1	6p12.2
hsa-mir-092-prec-X=092-2	miR-92	7.95E-05	0,00083	1,4	Xq26.2
hsa-mir-346No1	miR-346	8,42E-05	0,00084	1,2	10q23.2
hsa-mir-106bNo1	miR-106b	0,0002091	0,00178	1,2	7q22.1
hsa-mir-135-2-prec	miR-153a	0,0002363	0,00194	1,1	12q23.1
hsa-mir-219-lNo2	miR-219	0,0002515	0,00199	1,3	9q34.11
hsa-mir-34aNo1	miR-34a	0,000265	0,00203	1,1	1p36.22
hsa-mir-099b-prec-19No1	miR-99b	0,0003758	0,00259	1,1	19q13.41
hsa-mir-185- precNo2	miR-185	0,0003827	0,00259	1,2	22q11.21
hsa-mir-223-prec	miR-223	0,0004038	0,00265	1,4	Xq12
hsa-mir-211- precNo2	miR-211	0,0004338	0,00277	1,1	15q13.3
hsa-mir-135-1prec	miR-135a	0,0004648	0,00287	1,1	3p21.1
hsa-mir-127-prec	miR-127	0,0004748	0,00287	1,1	14q32.31
hsa-mir-203- precNo1	miR-203	0,0004993	0,00294	1,4	14q32.33
hsa-mir-212- precNo1	miR-212	0,0006339	0,00364	1,1	17p13.3
hsa-mir-095-prec-4	miR-95	0,0006996	0,00392	1,2	4p16.1
hsa-mir-017- precNo2	miR-17-5p	0,0007252	0,00392	1,3	13q31.3
MicroARNs con Expresión reducida en Tumores					
Sonda	**miR maduro**	**Valor p[1]**	**TDF[2]**	**Factor de Cambio**	**Localización cromosómica**
hsa-mir-342No2	miR-342	4.00E-06	0,00015	0,9	14q32.2

hsa-mir-192-2/3No1	miR-192	8.70E-06	0,00029	0,7	11q13.1
hsa-mir-1-2No2	miR-1	2.22E-05	0,00057	0,9	18g11.2
hsa-mir-34bNo2	miR-34b	4.73E-05	0,00069	0,8	11q23.1
hsa-mir-215- precNo1	miR-215	5.26E-05	0,00071	0,7	1q41
hsa-mir-192No1	miR-192	7.36E-05	0,00081	0,7	11q13.1
hsa-mir-301 No2	miR-301	7.44E-05	0,00081	0,7	17q23.2
hsa-miR-324-5pNo2	miR-324-5p	1.00E.04	0,00096	0,9	17p13.1
hsa-mir-030a- precNo2	miR-30a-3p	0,0001933	0,00171	0,9	6q13
hsa-mir-1-1 No2	miR-1	0,0002906	0,00216	0,9	20q13.33
hsa-mir-34cNo2	miR-34c	0,0007334	0,00392	0,9	11q23.1
hsa-mir-331 No2	miR-331	0,0008555	0,00446	0,9	12q22
hsa-mir-148bNo2	miR-148b	0,0008726	0,00446	0,9	12q13.13
Los valores P indicados son el resultado de análisis de comparación de emparejamiento de clases de modelos de expresión de microARN de 84 pares de adenocarcinomas de colon y tejido no tumoral. [2]TDF = Tasa de Descubrimientos Falsos					

Veintiséis microARN se expresaron a niveles más altos en tumores con enriquecimiento de miR-21 de a lo sumo 1,8 veces. Se diferencian perfiles globales de microARN entre pares de tejido tumoral y no tumoral con una precisión del 89 % usando cualquiera de los 3 algoritmos de predicción de los vecinos más cercanos o de clase centroide más cercana (validación cruzada con factor 10 de 100 repeticiones), lo que sugiere un cambio sistemático en los modelos de expresión de microARN durante la formación del tumor.

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

En tumores, todos los miR, se expresaron a niveles más altos: miR- 20a (2,3- veces), miR- 21 (2,8- veces), miR106a (2,4- veces), miR- 181b (1,4- veces) y miR- 203 (1,8- veces) ($p<0,001$, prueba de pares relacionados de Wilcoxon) (**Tabla 3a**).

Tabla 3 - Expresión de microARN en pares de tejido Tumoral frente a no Tumoral

Tabla 3a - la Cohorte de Validación de Hong Kong				
			Factor de cambio	
microARN	ΔΔCt[1]	DT (ΔΔ Ct)	tumores[2]	valor p[3]
miR-20a	1,18	0,97	2,3 veces	**p<0,001**
miR-21	1,47	1,20	2,8 veces	**p<0,001**
miR-106a	1,25	0,94	2,4 veces	**p<0,001**
miR-181 b	0,47	1,03	1,4 veces	**p<0,001**
miR-203	0,83	1,40	1,8 veces	**p<0,001**
Tabla 3b Expresión de microARN en pares de tejido de Adenoma frente a No adenoma				
	Promedio		Factor de cambio	
microR	ΔΔ Ct[1]	DT (ΔΔ Ct)	adenomas[2]	valor p[3]
miR-20a	-0,11	0,97	0,9 veces	p = 0,82

miR-21	0,64	0,90	1,6 veces	p = **0,006**
miR-106a	0,28	1,22	1,2 veces	p = 0,19
miR-181 b	0,30	1,24	1,2 veces	p = 0,27
miR-203	0,77	1,98	1,7 veces	p = 0,14

[1]Promedio (ΔCt tumoral- ΔCt no tumoral relacionado) o Promedio (Δct adenoma - ΔCt no adenoma relacionado) de cRT- PCR. [2]Calculado por $2^{\Delta\Delta}$. [3]Prueba de Wilcoxon de pares relacionados. DT = desviación típica. Los números en negrita son estadísticamente significativos. Para las comparaciones tumor/no tumor, se usaron 113 pares de tejidos para miR-20a y miR-203 mientras que se usaron 111 pares de tejidos para miR-21, miR-106a y miR-181b. Para todas las comparaciones de adenoma/no adenoma, se utilizaron 18 pares de tejidos.

La mayoría de los tumores (89 % para miR-20a, 87 % para miR-21, 90 % para miR-106a, 71 % para miR-181 b y 74 % para miR-203), tuvieron una expresión más alta de estos microARN en comparación con el tejido no tumoral emparejado. Los patrones de expresión para estos cinco microARN diferencian estados tumorales frente a no tumorales emparejados con una precisión del 96 % o 98 % basándose en 3 algoritmos de predicción de los vecinos más cercanos o de clase centroide más cercana, respectivamente (validación cruzada con factor 10, de 100 repeticiones).

Se usó hibridación *in situ* para visualizar la expresión miR-21 en tejido tumoral y no tumoral adyacente (véanse las **Figuras 1a-f**).

El miR-21 se expresó a altos niveles tanto en el núcleo como en el citoplasma de células epiteliales colónicas en tejido tumoral humano en comparación con tejido no tumoral adyacente. Estos resultados son coherentes con los datos de cRT-PCR y de micromatriz y confirman una función de los microARN en la carcinogénesis.

El miR- 21 se expresa a niveles más altos en adenomas de colon

Los adenomas representan una fase precursora de los adenocarcinomas de colon[3]. Se evaluaron los niveles de expresión de miR-20a, miR21, miR-106a, miR-181b y miR-203 por cRT-PCR en 18 pares de tejido de adenoma y no adenoma adyacente. Aunque cuatro de los cinco microARN mostraron niveles aumentados en el tejido de adenoma, solo el miR-21 tuvo un enriquecimiento significativamente mayor de 1,6 veces (p=0,006, prueba de Wilcoxon de pares relacionados) (véase la **Tabla 3b**).

El tejido de adenoma expresó a niveles más altos de miR-21 en 15/18 pares relacionados. Fases más avanzadas de tumores expresan niveles más altos de miR-21. Los sujetos se estratificaron basándose en el diagnóstico de adenoma y estadificación TNM, donde el adenoma se consideró el menos avanzado y la fase de la TNM la más avanzada. Los adenomas expresaron niveles más bajos de expresión miR-21 en comparación con los tumores de la cohorte de validación (p<0,001, ensayo de Mann-Whitney). Los tumores más avanzados expresaron niveles más altos de expresión miR-21 (ensayo de tendencia, p<0,001) (véase la Figura 1g).

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

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

Se analizaron proporciones de expresión tumoral/no tumoral (T/N) de microARN individual para determinar si alguno se asociaba con mal pronóstico. Las proporciones de expresión T/N del microARN se clasificaron como altas basándose en el tercil más alto. Se investigó cualquier microARN en el que altas proporciones T/N estaban asociadas con supervivencia de cáncer (p<0,05). De estos, se seleccionaron los microARN que se expresaban diferencialmente en tumores (p<0,001). Cinco microARN cumplieron estos criterios. El análisis de Kaplan-Meier indicó que cada una de las altas proporciones T/N para miR-20a (p=0,02), miR-21 (p=0,004), miR-106a (p=0,01), miR-181b (p=0,04), y miR- 203 (p=0,004) se asociaba con una mala supervivencia. Estos cinco microARN se seleccionaron para análisis posterior.

En este estudio, los adenocarcinomas de colon del 89-93 % de los sujetos eran de una histología típica. Una minoría de tumores procedía de histologías de adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso, o de carcinoma de células en anillo de sello (véase la Tabla 1). Diferentes subtipos de adenocarcinomas pueden asociarse con diferentes resultados clínicos, incluyendo pronóstico de supervivencia[31]. Para eliminar posibles confusiones asociadas con las histologías, se excluyó a todos los sujetos con adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso y carcinoma de células en anillo de sello del análisis inicial.

Las asociaciones de proporciones T/N con mala supervivencia podrían deberse a niveles de expresión de microARN en el tejido tumoral, en el tejido no tumoral circundante, o en una combinación de ambos. Para diferenciar estas posibilidades se analizó por separado la asociación de la expresión de microARN en tumores y en no tumores

relacionados. Cada uno de los altos niveles de expresión en tumores (basándose en el tercil más alto) para miR-20a, miR-21, miR106a, miR-181b y miR-203 se asoció con una mala supervivencia en la cohorte de ensayo de Maryland (véase la Figura 3a, también de datos no mostrados). En ninguno de los cinco microARN se observó asociación significativa con la expresión de microARN en tejido no tumoral.

Se utilizó el análisis univariable y multivariable de razón de riesgos (RR) de Cox para evaluar la asociación de niveles de expresión tumoral con pronóstico en individuos con adenocarcinoma típico (**Tabla 4a**).

Tabla 4 – Análisis Univariable y Multivariable de Regresión de Cox de Niveles de Expresión miR-21 y Supervivencia Global de Cáncer en Sujetos con Adenocarcinoma de Colon[1]

Tabla 4a	Cohorte de ensayo de Maryland			
	Análisis univariable		Análisis multivariable[2]	
Características	RR (IC del 95 %)	valor p	RR (IC del 95 %)	valor p
Expresión de miR-21[3] N=71				
Baja	1,0		1,0	
Alta	**2,5 (1,2-5,2)**	**0,01**	**2,9 (1,4-6,1)**	**0,004**
Fase TNM I-II	1,0		1,0	
III-IV	**3,5 (1,6-7,9)**	**0,002**	**3,4 (1,5-7,8)**	**0,004**
Edad en el momento de la incorporación < 50	1,0			
≥ 50	0,7 (0,2-2,3)	0,52		
Sexo Mujer	1,0			
Hombre	1,4 (0,5-3,9)	0,57		
Raza Blanca	1,0			
Negra	1,0 (0,5-2,1)	0,97		
Localización del tumor Distal	1,0			
Proximal	0,6(0,3-1,4)	0,26		
Tabla 4b	Cohorte de Validación de Hong Kong			
	Análisis Univariable		Análisis Multivariable[2]	
Características	RR (IC del 95 %)	valor p	RR (IC del 95 %)	valor p
Expresión de miR-21[3] n = 103				
Baja	1,0		1,0	
Alta	**2,4 (1,4-3,9)**	**0,002**	**2,4 (1,4-4,1)**	**0,002**
Fase TNM I-II	1,0		1,0	
III-IV	**4,7(2,4-9,5)**	**<0,001**	**4,7 (2,4-9,5**	**<0,001**
Edad en el momento de la incorporación < 50	1,0			
≥50	1,5 (0,9-2,6)	0,14		
Sexo Mujer	1,0			
Hombre	1,4 (0,8-2,3)	0,29		

Localización del tumor Distal	1,0			
Proximal	0,7 (0,3-1,4)	0,27		
La expresión de microARN se midió con micromatrices de miARN para la cohorte de Maryland y con cRT-PCR para la cohorte de Hong Kong. [1]Los casos con adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso o carcinoma de células en anillo de sello se excluyeron de este análisis. [2]Se descubrió que la adición y la eliminación gradual de covarianzas clínicas utilizado en el análisis multivariable se asociaba con supervivencia en modelos univariable (p<0,10) y los modelos finales solo incluyen las covarianzas que estaban asociadas significativamente con supervivencia (ensayo estadístico de Wald p<0,05). [3]La expresión alta en tumores de todos los miARN se definió basándose en el tercil más alto.				

Los individuos con tumores que expresaban altos niveles de miR-21 tenían un riesgo significativamente más alto de morir por cáncer de colon en los análisis tanto univariable (RR=2,5 [1,2-5,2], p=0,01) como multivariable (RR=2,9 [1,4-6,1], p=0,004).

Para validar estos descubrimientos, se usó cRT-PCR para medir los niveles de expresión tumoral y no tumoral de estos cinco microARN en la cohorte de validación de Hong Kong y se analizaron asociaciones con pronóstico. La expresión tumoral alta de miR-21 predice un mal propósito en la cohorte de validación de Hong Kong (p=0,001, ensayo de rango logarítmico de Kaplan-Meier) mientras que esto no ocurre en la expresión en tejido no tumoral (véase la Figura 3b).

En esta cohorte no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con pronóstico y expresión de miR-20a, miR-106a, 181b o miR-203.

En la cohorte de validación de Hong Kong, la alta expresión de miR-21 en tumores no se asoció significativamente con la edad, sexo, histología tumoral, o localización del tumor (ensayo exacto de Fisher). Todas las covarianzas se examinaron mediante análisis de razón de riesgo de Cox (**Tabla 4b**).

La alta expresión de miR-21 en tumores (RR=2,4 [1,4-3,9], p=0,002) y la estadificación TNM (RR=4,7 [2,4-9,5], p<0,001) se asociaron significativamente con supervivencia en modelos univariable. Un análisis multivariable de regresión de Cox demostró que la alta expresión de miR-21 en tumores predice mal propósito de supervivencia (RR=2,4 [1,4-4,1], p=0,002) independiente del resto de covarianzas clínicas, de acuerdo con los hallazgos encontrados en la cohorte de ensayo de Maryland.

El análisis se repitió incluyendo a todos los sujetos independientemente de su histología tumoral. En ambas cohortes, se mantuvo la asociación con alta expresión de miR-2 y pronóstico (véase la Figura 4, véase la **Tabla 5**).

Tabla 5 - Análisis Univariable y Multivariable de Regresión de Cox de Niveles de Expresión miR-21 y Supervivencia Global de Cáncer en Sujetos con Todos los Sujetos

Tabla 5a	Cohorte de Ensayo Maryland			
	Análisis univariable		Análisis multivariable	
Características	RR (IC del 95 %)	valor p	RR (IC del 95 %)	valor p
Expresión de miR-21[3] N=79				
Baja	1,0		1,0	
Alta	**2,0 (1,1-4,0)**	**0,04**	**2,1 (1,1-4,0)**	**0,03**
Fase TNM I-II	1,0		1,0	
III-IV	**3,2 (1,5-6,9)**	**0,002**	**3,2 (1,5-6,8)**	**0,003**
Edad en el momento de la incorporación <50	1,0			
≥50	0,7 (0,2-2,4)	0,59		
Sexo Mujer	1,0			
Hombre	1,6 (0,7-4,2)	0,33		
Raza	1,0			

Blanca				
Negra	1,0 (0,5-2,0)	0,99		
Localización del tumor Distal	1,0			
Proximal	0,8(0,3-2,1	0,65		
Histología Adenocarcinoma	1,0			
Mucinoso o Adenoescamoso	0,7 (0,3-2,1)	0,57		
Tabla 5b	Cohorte de Validación de Hong Kong			
	Análisis univariable		Análisis multivariable[2]	
Características	RR (IC del 95 %)	valor p	RR (IC del 95 %)	valor p
Expresión de miR-21[3] n= 111				
Baja	1,0		1,0	
Alta	**2,3 (1,4-3,9)**	**0,002**	**2,3 (1,4-3,9)**	**0,002**
Fase TNM I-II	1,0		1,0	
III-IV	**4,9 (2,5-97)**	**<0,001**	**4,9 (2,5-98)**	**<0,001**
Edad en el momento de la incorporación <50	1,0			
≥50	1,4 (0,8-2,4)	0,20		
Sexo Mujer	1,0			
Hombre	1,3 (0,8-2,3)	0,27		
Localización del Tumor Distal	1,0			
Proximal	0,7 (0,3-1,4)	0,27		
Histología Adenocarcinoma	1,0			
Mucinoso o Adenoescamoso	1,2 (0,4-3,3)	0,74		

La expresión de los microARN se midió con micromatrices de miARN para la cohorte de Maryland y con cRT-PCR para la cohorte de Hong Kong. [1]Todos los individuos se incluyeron en este análisis independientemente de su histología tumoral. [2]Se descubrió que la adición y la eliminación gradual de covarianzas clínicas utilizado en el análisis multivariable se asociaba con supervivencia en modelos univariable ($p<0,10$) y los modelos finales solo incluyen las covarianzas que estaban asociadas significativamente con supervivencia (ensayo estadístico de Wald $p<0,05$). [3]La expresión alta en tumores de todos los miARN se definió basándose en el tercil más alto.

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

La identificación de biomarcadores asociados con una respuesta a terapia adyuvante permitirá a los médicos predecir mejor los beneficios de la terapia. Para esta finalidad, se analizaron asociaciones con expresión de miR-21 y la respuesta a quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer en fase II y III. Se disponía de información sobre la administración de quimioterapia adyuvante de 47 sujetos de los 65 en fase II o III en la cohorte de ensayo de Maryland y de todos los sujetos en la cohorte de validación de Hong Kong.

En ambas cohortes, los regímenes quimioterapéuticos se basaban principalmente en fluorouracilo (en forma de fármaco intravenoso u oral de 5-fluorouracilo incluyendo tegafur con uracilo [UFT]) con o sin Levamisol o Leucovorina). Para este análisis solo se utilizaron sujetos con histología de adenocarcinoma típico, lo que condujo a 20 de 42 individuos en fase II/III que recibieron quimioterapia en la cohorte de Maryland. Para los que recibieron

quimioterapia, la expresión alta de miR-21 en tumores predijo empeoramiento de supervivencia global (p=0,01, ensayo de rango logarítmico de Kaplan-Meier) proporcionando confirmación preliminar de que una expresión alta de miR-21 está asociada con una mala respuesta a quimioterapia adyuvante.

En este análisis, para la cohorte de validación de Hong Kong, se utilizaron 77 individuos con cáncer en fase II/III con histología de adenocarcinoma típico. Los sujetos en fase II/III que recibieron quimioterapia adyuvante tenían mejor pronóstico de supervivencia en comparación con aquellos que no la recibieron (p=0,02, ensayo de rango logarítmico de Kaplan Meier). Entre estos sujetos que recibieron quimioterapia adyuvante (n=36), la expresión alta de miR-21 en tumores se asoció con una mala respuesta al tratamiento (p=0,03, ensayo de rango logarítmico de Kaplan-Meier), de acuerdo con las observaciones en la cohorte de Maryland (véase la Figura 5a).

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

Para analizar estas observaciones se utilizó análisis multivariable de regresión de Cox para mostrar que la expresión alta de miR-21 predecía un mal pronóstico (RR=3,1 [1,5-6,1]; p=0,001) y que la recepción de quimioterapia predecía resultados de supervivencia mejorados (RR=0,3 [0,1-0,5]; p<0,001) independientemente del resto de covarianzas clínicas (**Tabla 6a**).

Tabla 6 – Análisis Univariable y Multivariable de Regresión de Cox de la Expresión miR-21, Recepción de Quimioterapia Adyuvante y Supervivencia de Cáncer de Sujetos con Adenocarcinoma en Fase I-III[1]

Tabla 6a	Cohorte de Ensayo de Maryland			
	Análisis Univariable		Análisis Multivariable[2]	
Característica	RR (IC del 95 %)	valor p	RR (IC del 95 %)	valor p
Expresión de miR-21[3] N=77				
Baja	1,0		1,0	
Alta	**2,6 (1,3-5,1)**	**0,005**	**3,1 (1,5-6,1)**	**0,001**
No recibieron Quimioterapia Adyuvante	1,0		1,0	
Recibieron Quimioterapia Adyuvante	**04, (0,2-0,8)**	**0,01**	**0,3 (0,1-0,5)**	**<0,001**
Fase TNM II	1,0		1,0	
III	**2,8 (1,3-6,0)**	**0,008**	**5,4 (2,4-12)**	**<0,001**
Localización del tumor Distal	1,0		1,0	
Proximal	**0,3(0,1-1,0)**	**0,04**	**0,2 (0,1-0,8)**	**0,02**
Edad en el momento de la incorporación <50	1,0			
≥50	1,6 (0,8-3,1)	0,20		
Sexo Mujer	1,0			
Hombre	1,2 (0,6-2,3)	0,61		
Tabla 6b	Cohorte de Validación de Hong Kong			
	Análisis Univariable		Análisis Multivariable[2]	
Características	RR (IC del 95 %)	valor p	RR (IC del 95 %)	valor p
Expresión de miR-21[3] N=119				

Baja	1,0		1,0	
Alta	**2,6 (1,5-4,5)**	**0,001**	**3,0 (1,7-5,4)**	**<0,001**
No recibieron quimioterapia adyuvante	1,0		1,0	
Si recibieron quimioterapia adyuvante	**07, (0,4-1,2)**	**0,21**	**0,4 (0,2-0,8)**	**0,004**
Fase TNM II	1,0		1,0	
III	**3,2(1,7-6,1)**	**0,001**	**5,2 (2,6-11)**	**<0,001**
Localización Tumoral Distal	1,0		1,0	
Proximal	**0,4(0,2-0,8)**	**0,02**	**0,3 (0,1-0,7)**	**0,007**
Edad en el momento de la incorporación <50	1,0			
≥50	1,4(0,7-2,5)	0,32		
Sexo Mujer	1,0			
Hombre	1,3 (0,7-2,2)	0,44		

La expresión de los microARN se midió con cRT-PCR para la cohorte de Hong Kong. [1]Todos los individuos en fase TNM II/III con histología de adenocarcinoma típico se incluyeron en este análisis. [2]Se descubrió que la adición y la eliminación gradual de covarianzas clínicas utilizado en el análisis multivariable se asociaba con supervivencia en modelos univariable (p<0,10) y los modelos finales solo incluyen las covarianzas que estaban asociadas significativamente con supervivencia (ensayo estadístico de Wald p<0,05). [3]La expresión alta en tumores de todos los miARN se definió basándose en el tercil más alto. La raza no se asoció con mal pronóstico.

Los análisis que utilizaban recaída de cáncer como un criterio de valoración final, en lugar de muerte por cáncer, dieron como resultado asociaciones similares con altos niveles de expresión de miR-21 en tumores que predecían una recurrencia de enfermedad más rápida (datos no mostrados).

Un análisis de combinación de ambas cohortes dio como resultado asociaciones similares. El análisis de Kaplan-Meier demostró que la alta expresión de miR-21 predice un mal pronóstico en cualquiera de los sujetos en fase II (p=0,02) o fase III (p=0,004) (Véase la Figura 6).

La alta expresión de miR-21 predice una mala respuesta a quimioterapia en sujetos en fase II/III (p=0,003) o solo en sujetos en fase III (p=0,007). El análisis multivariable de regresión de Cox demostró que la alta expresión de miR-21 predecía mal pronóstico (RR=3,0 [1,7-5,4]; p<0,001) y que el tratamiento con quimioterapia adyuvante predecía supervivencia mejorada (RR=0,4 [0,2-0,8]; p=0,004) independientemente del resto de covarianzas clínicas (Tabla 6b).

Discusión

Se analizaron perfiles de microARN en tejidos de cáncer de colon usando dos cohortes independientes. Treinta y siete microARN se expresaron diferencialmente en tejidos tumorales por análisis de micromatriz de microARN. Los patrones de expresión de los cinco microARN ensayados se validaron en la cohorte de Hong Kong. El poder discriminatorio de los cinco microARN para diferenciar entre tejido tumoral y no tumoral indica que, durante la tumorigénesis, se producen cambios predecibles y sistemáticos de los modelos de expresión de microARN y que probablemente son representativos de la mayoría de los adenocarcinomas esporádicos de colon.

También se encontró que todos los miR- 20a, miR- 21, miR- 106a, miR- 181b y miR- 203 se expresaban a altos niveles en tumores de colon. Estos cambios en los modelos de expresión de microARN solo pueden asociarse con cáncer de colon o pueden ser la causa hacia la progresión histológica para el cáncer. Existen evidencias firmes que sugieren que los cambios en los modelos de expresión de microARN promueven la formación tumoral, especialmente para miR-20a y miR-21. miR-20a es parte del grupo de microARN policistrónico miR-17-92[32].

La sobreexpresión de este grupo potencia la proliferación celular *in vitro*[33] y acelera la formación de tumores en modelos animales[16]. La expresión forzada del grupo miR-17-92 produce un aumento del tamaño tumoral y

vascularización tumoral en ratones regulando negativamente la proteína Tspl anti-angiogénica[24]. Pruebas experimentales también sugieren que la expresión aumentada de miR-21 promueve el desarrollo tumoral. miR-21 se expresa a altos niveles en la mayoría de los tumores sólidos[19,34]. La sobreexpresión de miR-21 actúa como un factor anti-apoptótico en células humanas de glioblastoma[13]. La inhibición de miR-21 inhibe el crecimiento celular *in vivo* e inhibe el crecimiento celular en modelos de xenoinjerto de ratón a través de la regulación negativa indirecta del factor anti-apoptótico Bcl-2[35]. Estudios realizados en líneas celulares humanas han demostrado que miR-21 también puede dirigir los genes supresores tumorales PTEN[36] y TPM1[37]. Considerados todos estos datos en su conjunto confirman una función causal para la expresión alterada de microARN durante la tumorigénesis.

Los adenomas representan una fase precursora de adenocarcinoma. Los adenomas expresan altos niveles de miR-21. Si la expresión aumentada de miR-21 promueve la progresión de tumor de colon, la expresión aumentada en adenomas puede ser un acontecimiento celular temprano en la progresión a cáncer. La inhibición de la actividad de miR-21 puede ayudar a prevenir el ascenso tumoral en poblaciones en alto riesgo de cáncer de colon, tales como individuos con poliposis adenomatosa hereditaria[38].

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

En cada cohorte, estas asociaciones eran independientes de las restantes covarianzas clínicas, lo que indica que la expresión de miR-21 puede ser un indicador de pronóstico útil, además de la estadificación TNM y otros parámetros clínicos, para ayudar a identificar pacientes con un riesgo más alto de cáncer terminal. Estas observaciones se realizaron en dos cohortes independientes con composiciones raciales y geográficas muy diferentes. Por lo tanto, es probable que las observaciones se apliquen generalmente a otras poblaciones.

En ambas cohortes, la expresión alta de miR-21 en tumores se asoció con una mala respuesta a quimioterapia adyuvante. Estos resultados pueden ayudar a predecir los beneficios de la terapia en individuos cuyo estado de expresión miR-21 se conoce. Además, si la expresión alta de miR-21 es causal para la mala supervivencia de pacientes con cáncer de colon, los antagomirs[29,39] u otros agentes terapéuticos antisentido que se dirigen al miR-21 pueden tener beneficios terapéuticos en sujetos con tumores que expresan miR-21 a altos niveles. Esto puede usarse junto con las terapias actuales para mejorar los resultados de supervivencia.

Los autores de la presente invención han encontrado diferencias sistemáticas en modelos de expresión de microARN entre tejido tumoral y no tumoral relacionado de cáncer de colon. La alta expresión de miR-21 en tumores predice resultados de mala supervivencia y mala respuesta a quimioterapia adyuvante en dos cohortes independientes, independientemente de la estadificación y de otras covarianzas clínicas lo que sugiere que esto puede ser un biomarcador de diagnóstico útil para adenocarcinomas de colon y pronóstico de supervivencia incluyendo respuesta a terapia.

Métodos

Recogida de tejidos y aislamiento de ARN:

Se recogieron pares de tejidos tumorales primarios de colon y no tumorales adyacentes procedentes de 84 pacientes pertenecientes al Centro Médico de la Universidad de Maryland entre 1993 y 2002, y de 113 pacientes pertenecientes al Hospital Queen Mary en Hong Kong entre 1991 y 2000. Se recogieron los antecedentes detallados de cada donante de tejido, incluyendo la edad, sexo, estado clínico, localización del tumor, tiempo de supervivencia desde el diagnóstico y recepción de quimioterapia adyuvante. La histopatología tumoral se clasificó de acuerdo con la clasificación de sistemas Tumorales de la Organización Mundial de la Salud[1]. El tejido de adenoma se obtuvo de la Cooperative Human Tissue Network. Este estudio fue autorizado por el Comité de Evaluación Institucional de los National Institutes of Health, el Comité de Evaluación Institucional de la Universidad de Hong Kong/Hospital Authority Hong Kong West Cluster y del Comité de Evaluación Institucional de la Investigación de Sujetos Humanos en la Universidad de Maryland.

Aislamiento de ARN y perfilado de microARN:

El ARN se extrajo de los tejidos utilizando métodos convencionales con TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad). El perfilado de micromatrices del microARN se realizó como se ha descrito anteriormente[30]. En resumen, se marcaron 5 µg de ARN total y se hibridaron con cada micromatriz de microARN que contenía cuadruplicados de aproximadamente 400 sondas de microARN humano. Los portaobjetos se exploraron utilizando un escáner LX5K ScanArray de PerkinElmer. La cRT-PCR de los microARN se realizó usando ensayos Taqman de microARN (Applied Biosystems, Foster City) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el sistema RT-PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems, Foster City). U6B fue el control de normalización para todos los experimentos de cRT-PCR. Todos los ensayos se realizaron por duplicado (miR-20a, miR-203) o por triplicado (miR-21, miR-106a, miR-181b), se

realizaron cRT-PCR para miR-21, miR-106a y miR-181b por AJS, al que se le ocultó los resultados de supervivencia y datos clínicos para los miembros de la cohorte de validación en ese momento.

Análisis de micromatriz:

Los datos analizados en esta publicación se han depositado en la NCBI Gene Expression Omnibus (GEO, http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) y se accede a ellos a través del número de registro de la Serie GEO GSE7828. Los datos de micromatriz normalizados LOESS se importaron en herramientas de matriz BRB 3.5.0 (http: // linus.nci-nih.gov/.BRB- ArrayTools.html) y todos los análisis de micromatriz posteriores se realizaron con este programa informático.

Se realizaron análisis de micromatriz. Las sondas con valores de error de >20 % de las matrices se eliminaron del análisis dejando 230 sondas. El análisis relacionado, de comparación de clases, identificó los microARN que se expresaban diferencialmente en tumores ($p<0,001$).

Para buscar inicialmente los microARN asociados con mala supervivencia, se analizaron las proporciones de expresión tumoral/no tumoral (T/N) de los microARN en la cohorte de Maryland usando datos de micromatriz. Las proporciones de expresión T/N para los microARN se crearon restando los valores de expresión no tumorales $\log_2$ de la expresión de tumores $\log_2$. Los microARN que carecían de >25 % de proporciones T/N se filtraron dejando 208. Las proporciones de expresión T/N se dicotomizaron clasificando el tercil más alto como alto y clasificando los dos terciles más bajos como bajos (véase Métodos Complementarios). Este valor límite alto/bajo se usó universalmente en todo el estudio. Los niveles de expresión de microARN tumoral y no tumoral se normalizaron en lote basándose en la fecha de los experimentos con micromatriz para todos los análisis de asociaciones con supervivencia.

Hibridación *In Situ*:

Se realizó hibridación *in situ* (HIS) con sondas de miR-21 humano, mezclado y U6 (Exiqon, Wobum) con una versión modificada del protocolo del fabricante para tejido incluido en parafina fijado en formalina (FFPE) escrito por W. Kloosterman (http://www.exigon.com/uploadsALNA 52- FFPE miRNA in situj.rotocol.pdf) en tejido de colon humano. Las modificaciones incluyeron el uso de anticuerpo anti-DIG de conejo policlonal conjugado con HRP y el Sistema de Aplicación de Señal GenPoint Tyramide de DakoCytomation (DakoCytomation, Carpinteria) y como sustrato el VECTOR® NovaRed™ (Vector Laboratories, Burlingame). Se tomaron imágenes en un microscopio Olympus BX40 usando la cámara digital Olympus DP70 y el programa informático DP controller (Olympus, Champaign).

Análisis estadístico:

Se realizó análisis estadístico. Se utilizó la prueba de Wilcoxon de pares relacionados para analizar diferencias en la expresión de microARN entre tejido tumoral y no tumoral emparejado así como diferencias entre tejido de adenoma y no adenoma emparejado en todos los datos de cRT-PCR. Todos los ensayos de tendencia descritos son ensayos no paramétricos de tendencia entre grupos ordenados. Todos los análisis de Kaplan-Meier se realizaron con WINSTAT 2001 (R. Fitch Software). El análisis multivariable de regresión de Cox se realizó usando Intercooled Stata 9.2 (StataCorp LP, College Station). Los modelos multivariable finales se basaron en la adición gradual y retirada de covariables clínicas que se descubrió que estaban asociadas con una mala supervivencia en modelos univariable ($p<0,10$). Se utilizó una estadística de Wald de $p<0,05$ como criterio para la inclusión en modelos multivariable finales. Todos los valores p indicados son bilaterales. Las proporciones de riesgo se indican con intervalos de confianza del 95 % entre paréntesis. Se realizaron gráficos de expresión usando Graphpad Prism 4.0 (Graphpad Software Inc., San Diego),

Análisis de micromatriz adicionales

Las micromatrices utilizadas para este análisis eran micromatrices de microARN aplicado puntualmente (de la Universidad del Estados de Ohio, Comprehensive Cancer Center, versión 2.0). Las intensidades de cada mancha eran la mediana de las intensidades del primer plano. Cada una de las 170 micromatrices utilizadas para este estudio contenía 11520 manchas. Todas las manchas en las que la intensidad del primer plano era menor que el fondo se reasignaron como NA (NA marca manchas de datos ausentes). Todas las manchas señalizadas como deficientes por el escáner también se reasignaron como NA. Todas las manchas blancas (sin oligo) con una alta intensidad de primer plano se reasignaron como NA. Cada oligo microARN se representó por manchas cuadruplicadas en estas matrices como dos pares distantes de dos manchas adyacentes. Si había de 0 a 1 NA para un cuádruple oligo, y las medias de los pares oligo distantes diferían en > 1 en la escala logarítmica$_2$, todas las manchas por cuadruplicado se reasignaban como NA. Si había 2 NA para un cuádruple oligo y las dos intensidades de mancha no-NA eran diferentes en > 1 en la escala logarítmica$_2$, todas las manchas por cuadruplicado se reasignaron como NA. Si había 3 manchas NA para un cuádruple, la mancha final se reasignaba como NA. En total, se reasignaron 1.082.689 de 1.958.400 manchas como NA usando estos métodos. Se realizó normalización LOESS (Atenuación de la Gráfica de Dispersión Localmente Ponderada) usando el paquete informático R. Después, todos los datos se importaron en la herramienta de matriz BRB versión 3.5.0 para análisis y todas las manchas duplicadas

se promediaron. Se usaron originalmente 85 pares de matrices (tejido tumoral y no tumoral emparejado). Se descubrió después que un caso que se identificó originalmente con un paciente con carcinoma de colon incidente se había diagnosticado como carcinoma *in situ* y se eliminó del análisis dejando la población de estudio con 84 sujetos. Las listas de los microARN se filtraron para incluir solo los 389 conjuntos de sonda de hsa-miR humano. Se filtraron posteriormente para eliminar cualquier conjunto de sonda ausente de más del 25 % de las matrices, dejando 230 conjuntos de sonda de microARN humano. Se usó análisis de comparación de clase emparejado para identificar los microARN que se expresaron diferencialmente entre tejido tumoral y no tumoral emparejado. Para dos microARN (miR-18 1b y miR-338), dos sondas independientes que medían cada uno dieron resultados contradictorios mostrando una sonda una mayor expresión en tumores y mostrando una sonda una menor expresión en tumores para cada microARN. Para cada una se descartó el resultado menos significativo que designó miR-18 1b y miR-388 como tumores enriquecidos. Adicionalmente, la cRT-PCR confirmó que miR-18b estaba enriquecido en tumores.

Inicialmente se utilizaron perfiles de expresión tumor/no tumor (T/N) para cada microARN para buscar los microARN que estaban asociados con una mala supervivencia. Para este análisis, se decidió dicotomizar todos los datos de expresión con un límite universal alto y bajo para buscar asociaciones con mala supervivencia. Para determinar que límite universal alto/bajo usar, se dicotomizaron los datos de expresión T/N de tres maneras distintas y se determinó que método daba el mayor número de resultados significativos en la cohorte de ensayo. La alta expresión se clasificó basándose en mayor que la mediana, el mayor tercil o el mayor cuartil y se evaluaron asociaciones con estos límites con una mala supervivencia usando análisis de regresión de Cox univariable. De los 37 microARN que se expresaron diferencialmente en tumores, la alta expresión de cuatro se asoció con una mala supervivencia basándose en mayor que la mediana, cinco basándose en el mayor tercil y dos basándose en el mayor cuartil ($p<0,05$, datos no mostrados). La dicotomización basada en el tercil más alto dio la mayoría de los microARN asociados con mala supervivencia basándose en estos criterios en la cohorte de ensayo Maryland; por lo tanto, la clasificación basada en el tercil más alto se usó uniformemente a lo largo de este estudio para analizar asociaciones entre los niveles de expresión de microARN y un mal pronóstico tanto en la cohorte de ensayo de Maryland como en la cohorte de validación de Hong Kong.

Para comparar los niveles de expresión de miR-21 en tumores con pronóstico se utilizan micromatrices de microARN. La sonda de micromatriz utilizada para este análisis fue hsa-miR-21-precI7Nol. Este análisis requiere normalización discontinua de los datos basada en la fecha del experimento de micromatriz. Para normalizar por fecha, las matrices que expresan el mayor 1/3 de un microARN determinado se clasificaron como altas para cada día por separado. Hasta doce pares de tejido se perfilaron en cualquier día determinado. Para cualquier día en el que se realizaron menos de 10 pares de micromatrices, las matrices realizadas en estos días se desecharon, dando como resultado la pérdida de 5 pares de matrices. Después estos datos se combinaron entre sí para análisis de asociaciones con resultados de supervivencia. Se comprobaron y no se descubrieron diferencias significativas en la distribución de frecuencia de edad, sexo, raza, localización del tumor, estado de TNM o supervivencia de cáncer entre los grupos clasificados basándose en los datos del experimento con micromatriz (ensayo exacto de Fisher).

Análisis estadístico

Se usó regresión de riesgos proporcionales de Cox para analizar el efecto de los niveles de expresión de miR-21 y otras variables clínicas sobre la supervivencia de los pacientes. Las variables clínicas incluidas eran edad, sexo, raza, localización del tumor, histología del tumor, recepción de terapia adyuvante y estadificación TNM. Para estos modelos, se ha seleccionado dicotomizar la edad como una edad > 50 frente a una edad < 50 ya que la edad de exploración recomendad para el cáncer de colon es la edad de 50; la localización tumoral se definió como proximal si el tumor estaba localizado dentro o próximo a la flexura esplénica y distal si el tumor se localizaba dentro o distal al colon descendente; la estadificación TNM se dicotomizó basándose en la enfermedad metastásica frente a no metastásica dando como resultado un estado I-II frente a III-IV. Un paciente de la cohorte de Maryland murió el día de la cirugía dando como resultado un tiempo de supervivencia de 0 meses. Este caso se incluyó en el análisis de Kaplan-Maier y se eliminó del análisis de regresión de Cox ocasionando la diferencia en casos entre la expresión de miR-21 en tumores para la Figura 2 (n = 72) y el número de casos en la Tabla 4. El análisis de regresión de Cox (n = 71). Se realizó regresión de Cox univariable sobre cada covariable clínica para examinar la influencia de cada una en la supervivencia del paciente. Los modelos multivariable finales se basaban en la adición gradual y retirada de covariables clínicas que se descubrió que estaban asociadas con una mala supervivencia en modelos univariable ($p<0,10$). Se usó una estadística de Wald de $p<0,05$ como criterios para inclusión en modelos de multivariable finales. Se usó el modelo de regresión de Cox más parsimonioso para el modelo multivariable final.

EJEMPLO 2 – RESULTADOS INICIALES

Los miARN se expresan diferencialmente en tumores de colon

Se analizaron perfiles de miARN de 85 pares de tejidos de colon cancerosos y no cancerosos adyacentes usando micromatrices de miARN. Se observó que los perfiles de expresión de miARN de tumores eran muy diferentes a los de los tejidos normales lo que sugiere que el miARN puede desempeñar funciones significativas en la carcinogénesis de colon. El análisis de comparación de clases emparejado identificó 27 miARN independientes que se expresaban diferencialmente en estos tumores (**Tabla 7**).

Tabla 7 – los 27 miARN se expresan diferencialmente en tumores de colon en comparación con tejido normal emparejado. Se descubrió que 27 miARN se expresaron diferencialmente en tumores usando análisis de comparaciones de clases emparejadas en herramientas de matriz BRB 3.4. Se utilizó un valor de significación p < 0,001 como criterio para expresión diferencial que dio como resultado una tasa de descubrimiento falso estimada de 0,08 %. Aumento se refiere a los miARN que se expresaron a niveles más altos en tumores mientras que disminución indica que los niveles de miARN eran menores en tumores.

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

La tasa de descubrimientos falsos, para representar el ensayo de comparaciones múltiples, fue aproximadamente del 0,8 % lo que indica que la mayoría, si no todos los miARN, se expresaron diferencialmente y no el resultado de ensayo de comparaciones múltiples. Se encontró que once de los miARN tenían niveles de expresión elevados en tumores mientras que se encontró que 16 de los miARN estaban reducidos en tumores. Además, podían usarse perfiles de miARN para predecir si el tejido era o no tumoral o no tumoral con una precisión de 92 %. Basándose en 2000 permutaciones al azar, la probabilidad de que estas predicciones se produjeran por posible azar era extremadamente baja (p < 0,0005). Estos resultados muestran que hay diferencias sistemáticas en los perfiles de expresión de miARN entre tumores y tejido normal lo que indica que los perfiles de expresión de miARN se modifican durante la carcinogénesis de colon.

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

Se determinó si los perfiles de expresión de miARN predecían la supervivencia de pacientes. Para este análisis se calcularon las proporciones de expresión de miARN normal frente a tumoral (proporción T/N) para cada miARN para cada individuo. El agrupamiento jerárquico no supervisado de todas las proporciones T/N de miARN agrupó a los individuos en dos grupos arbitrariamente marcados grupo A y grupo B (Figura 7).

Estos dos grupos difieren significativamente en la estadificación clínica (p = 0,009; figura 1b) y pronóstico de supervivencia (p = 0,026; figura 7c).

Esto indica que los perfiles globales de miARN son predictivos de estadificación clínica y, lo que es más importante, pronóstico de supervivencia.

Se utilizó análisis de regresión de Cox univariable y multivariable para averiguar esta relación con más detalle (**Tabla 8**).

Tabla 8 Análisis de Regresión de Cox de Perfiles de miARN globales

Se realizaron análisis de regresión de Cox univariable (parte superior) y multivariable (parte inferior) para demostrar que los individuos clasificados en el grupo B de miARN tenían un mayor riesgo de morir por cáncer de colon. Ni la edad, el sexo ni la raza eran contribuidores significativos para riesgo de supervivencia. Para los fines de estos análisis, la edad se dicotomizó en mayor de o menor de 50 y la raza se dicotomizó en raza Afro Americana (AA) y Caucásica		
Análisis Univariable		
Variable	RR (IC 95 %)	valor p
Grupo B/A	2,6 (1,0 - 6,3)	0,042
edad ≥ 50/edad < 50	0,62 (0,14 - -2,7)	0,53
Hombre/Mujer	1,4 (0,48 - 4,0)	0,54
AA/Caucásica	1,1 (0,83 - 2,3)	0,83
Multivariable, ajustada para edad, sexo y raza		
Grupo B/A	2,7 (1,1 - 6,8)	0,034
edad ≥ 50/edad < 50	0,49 (0,11 - -2,2)	0,35
Hombre/Mujer	1,5 (0,52- 4,4)	0,45
AA/Caucásica	1,0 (0,45 - 2,2)	0,99

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

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

Se identificaron los miARN individuales cuyos niveles de expresión predecían pronóstico de cáncer de colon. Se utilizaron las gráficas de supervivencia de Kaplan Meier y análisis de regresión de Cox multivariable en proporciones T/N para identificar los patrones de expresión de miARN que estaban asociados con un mal pronóstico de supervivencia. Se utilizaron herramientas de matriz BRB para identificar proporciones T/N correlacionadas con una mala supervivencia (datos no mostrados). Se eligió analizar estos miARN con mayor detalle. También se analizó cualquier miARN que se expresaba diferencialmente en tumores (p < 0,01). Las proporciones T/N para cada individuo se dicotomizaron basándose en la mediana o el cuartil más alto de las proporciones T/N. También se eliminó cualquier miARN del análisis en el que las proporciones T/N están ausentes en más de 18 individuos. Se identificaron al menos 9 miARN, incluyendo miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-16h, miR-203, let-7g, miR- 29a, miR-103-2 y miR-10a cuyas proporciones T/N predecían pronóstico de cáncer de colon (Figura 8, **Tabla 9**).

Análisis de regresión de Cox de proporciones T/N para los miARN individuales

Se realizaron análisis univariable y multivariable de regresión de Cox para demostrar que las proporciones T/N de

los miARN individuales podrían usarse para clasificar individuos con mayor riesgo de morir por cáncer de colon. Las proporciones T/N de estos 9 miARN eran indicadores significativos de pronóstico de supervivencia independiente de la estadificación TNM, edad, sexo y raza. Obsérvese que las diferencias Alto/Bajo para miR-16b, miR-21, miR-29a, miR-103-2, miR- 106a y miR-203 se clasificaron basándose en la mediana de los valores de proporción T/N mientras que let-7g, miR-10a y miR-181b se clasificaron basándose en las proporciones T/N de cuartil más alto.

Tabla 9: Análisis de regresión de Cox de proporciones T/N para los miARN individuales

Variable	RR (IC del 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
miR-21 Alto/Bajo	3,0 (11,3 - 7,0)	0,01	80
Análisis multivariable			
miR-21 Alto/Bajo	2,8 (1,2 - 6,8)	0,02	
edad ≥ 50/edad < 50	0,46 (0,10 - 2,1)	0,32	
hombre/mujer	3,1 (0,9 - 11,0)	0,07	
AA/Caucásica	1,2 (0,5 - 2,7)	0,66	
Fase III-IV / Fase I - II	4,4 (1,6 - 11,9)	0,004	
Análisis univariable			
miR-181b Alto/Bajo	3,4 (1,6 - 7,5)	0,002	78
Análisis multivariable			
miR-181b Alto/Bajo	3,3 (1,3 - 8,2)	0,01	
Edad ≥ 50/edad < 50	0,39 (0,08 - 1,8)	0,23	
Hombre/Mujer	2,2 (0,7 - 7,2)	0,17	
AA/Caucásica	1,1 (0,5 - 2,5)	0,82	
Fase III-IV / Fase I - II	3,1 (1,2 - 8,1)	0,02	
Análisis univariable			
let-7g Alto/Bajo	2,7(1,3 - 5,9)	0,01	84
Análisis multivariable			
let-7q Alto/Bajo	2,5 (1,1 - 5,5)	0,03	
edad ≥ 50/edad < 50	0,5 (0,1 - 2,4)	0,39	
Hombre/Mujer	1,5 (0,5 - 4,4)	0,50	
AA/Caucásica	1,3 (0,6 - 2,9)	0,50	
Fase III-IV / Fase I - II	3,6 (1,4 - 9,2)	0,006	
Variable	RR (IC 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
miR-103-2 Alto/Bajo	2,5 (1,1 - 5,6)	0,03	81
Análisis multivariable			
miR-103-2 Alto/Bajo	3,1 (1,3 - 7,5)	0,01	
edad ≥ 50/edad < 50	0,5 (0,1 - 2,2)	0,36	

Hombre/Mujer	1,6 (0,6 - 4,9)	0,38	
AA/Caucásica	0,8 (0,4 - 1,9)	0,69	
Fase III-IV / Fase I - II	4,4 (1,7 - 11,1)	0,002	
Variable	RR (IC 95 %)	p =	n
Análisis univariable			

Variable	HR (95 % CI)	p =	n
miR-16b Alto/Bajo	4,6 (1,7 - 12,5)	0,003	69
Análisis multivariable			
miR-16b Alto/Bajo	5,1 (1,8 - 15,9)	0,003	
edad ≥ 50/edad < 50	0,4 (0,08 - 1,7)	0,20	
Hombre/Mujer	3,2 (0,8 - 1,7)	0,12	
AA/Caucásica	0,9 (1,9 - 22,4)	0,003	
Fase III-IV / Fase I - II	6,5 (1,9 - 22,4	0,003	
Variable	RR (IC 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
miR-106a Alto/Bajo	2,6 (1,1 - 6,1)	0,01	82
Análisis multivariable			
miR-106a Alto/Bajo	2,4 (1,0 - 5,7)	0,05	
edad ≥ 50/edad < 50	0,54 (0,11 - - 2,5)	0,44	
Hombre/Mujer	1,8 (0,5 - 6,5)	0,34	
AA/Caucásica	1,1 (0,5 - 2,5)	0,84	
Fase III-IV / Fase I - II	5,4 (1,8 - 16,0)	0,002	
Variable	RR (IC 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
miR-203 Alto/Bajo	3,8 (1,4 - 10,5)	0,01	57
Análisis multivariable			
miR-203 Alto/Bajo	3,2 (1,1 - 9,4)	0,03	
edad ≥ 50/edad < 50	1,0 (0,1 - -8,1)	0,97	
Hombre/Mujer	1,4 (0,4 - 5,1)	0,61	
AA/Caucásica	0,9 (0,4 - 2,3)	0,83	
Fase III-IV / Fase I - II	3,9 (1,3 - 11,8)	0,02	
Variable	RR (IC 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
miR-29a Alto/Bajo	3,1 (1,3 - 7,3)	0,01	77

Análisis multivariable			
miR-29a Alto/Bajo	3,2 (1,3 - 7,9)	0,01	
edad ≥ 50/edad < 50	0,5 (0,1 - -2,2)	0,35	
Hombre/Mujer	2,2 (0,6 - 7,4)	0,22	
AA/Caucásica	0,9 (0,4 - 2,1)	0,76	
Fase III-IV / Fase I - II	4,5 (1,7 - 12,2)	0,003	
Análisis univariable			
miR-10a Alto/Bajo	2,7 (1,3 – 5,7)	0,01	84
Análisis multivariable			
miR-10a Alto/Bajo	3,5 (1,5 - 7,8)	0,003	
edad ≥ 50/edad < 50	0,4 (0,1 - -1,9)	0,26	
Hombre/Mujer	1,7 (0,6 – 5,0)	0,34	
AA/Caucásica	1,0 (0,45 - 2,3)	0,98	
Fase III-IV / Fase I - II	4,9 (1,9 - 12,2)	0,001	

La expresión de miR-21 es elevada en tumores (Tabla 7). Las proporciones T/N de miR-21 también se asociaron con estadificación clínica y también con pronóstico de supervivencia para pacientes con cáncer de colon (Tabla 9, Figura 8a).

Hubo una tendencia a que los individuos con estadificación TNM más avanzada tenían mayores proporciones T/N (p = 0,034). Las proporciones T/N se dicotomizaron basándose en las medianas de valores para cada uno de los 80 individuos con datos. Los individuos con elevadas proporciones de expresión T/N de miR-21 tenían un peor pronóstico de supervivencia basándose en el análisis Kaplan Meier (p = 0,004) lo que sugiere que los tumores que expresan altos niveles de miR-21 son predictivos de mal pronóstico. Estos resultados se analizaron adicionalmente con análisis de regresión de Cox.

Los individuos con altas proporciones T/N de miR-21 tenían un mayor riesgo con análisis univariable (RR = 3,0; p = 0,01) y multivariable (RR = 2,8; p = 0,02) ajustando edad, sexo, raza y estadificación TNM (Tabla 9).

Este resultado sugiere que los niveles de expresión miR-21 pueden ser útiles como métodos de predicción de pronóstico y puede proporcionar más valor predictivo para el pronóstico de supervivencia en comparación con la estadificación TNM solo. Se encontró que miR-21 se expresaba diferencialmente en muchos tipos de tumores[12-18].

Los estudios también demostraron que los altos niveles de miR-21 podían conducir a una inhibición de apoptosis en células de glioblastoma[5] mientras que la inhibición de miR-21 puede conducir a un aumento de la proliferación celular en células HeLa[19].

Los autores de la presente invención descubrieron que miR-21 se piensa ahora que contribuye a la carcinogénesis de colon de una manera similar.

Se descubrió que miR-106a elevada en tumores (Tabla 7) y las proporciones T/N de miR-106a estaban asociadas con un pronóstico de supervivencia (Tabla 9, Figura 8b).

MiR-106a es un miembro de una clase de miARN parálogos incluyendo miR- 17, miR- 20, miR- 106a y miR-106h[20]. Estos miARN son muy similares entre sí ya que difieren solo en 1-2 nucleótidos. Debido a su similitud, probablemente todos tengan similares dianas. De manera interesante, los cuatro de estos miARN muestran modelos de expresión similares y asociaciones con pronóstico (datos no mostrados). En el presente documento se presentan asociaciones para miR-106, pero no se descarta formalmente la posibilidad de que cualquiera o todos de los otros parálogos de miARN contribuyan a esta asociación. Las proporciones T/N de miR-106a se dicotomizaron basándose en las medianas de valores para cada uno de los 82 individuos con datos. Los individuos con altas proporciones de expresión T/N de miR-106a tuvieron un peor pronóstico de supervivencia basándose en el análisis de Kaplan Meier (p = 0,013; Figura 8b).

Esto sugiere que los tumores que expresan altos niveles de miR-106a son predictivos de un mal pronóstico de

supervivencia. Los individuos con proporciones T/N elevadas de miR-106a tenían un mayor riesgo con análisis tanto univariable (FIR = 2,6, p = 0,01) como Multivariable (RR = 2,4; p = 0,05) ajustando con respecto a edad, sexo, raza y estadificación TNM (Tabla 7). Por lo tanto, miR-106a puede ser un indicador de pronóstico útil de pronóstico de cáncer de colon independientemente de la estadificación TNM. De manera interesante, se demostró que el gen supresor tumoral de retinoblastoma era una diana funcional de miR-106a[12], lo que confirma un mecanismo de cómo miR-106a puede contribuir mecánicamente a carcinogénesis de colon.

Las sobreexpresión del grupo miR-17-92, que contiene parálogos de miR-106a, dio como resultado un desarrollo tumoral acelerado en ratones[10]. Esto muestra experimentalmente que los miARN de la familia miR-106a son capaces de influir en la carcinogénesis, reforzando adicionalmente la hipótesis de que miR-106a puede contribuir a la carcinogénesis y progresión tumoral.

Los modelos de expresión de siete miARN adicionales se asociaron con estadificación clínica y una mal pronóstico de supervivencia (Tabla 9, Figuras 8c-8i).

Hubo una tendencia a que los individuos diagnosticados con estadificación TNM más avanzada tuvieran mayores proporciones T/N para let-7a (p = 0,010), miR-10a (p = 0,008), miR-16h (p= 0,048), miR-29a (p = 0,005), miR-103-2 (p = 0,033), miR-181h (p = 0,016) y miR-203 (p = 0,016) (Figura 8).

Las proporciones T/N se dicotomizaron basándose en la mediana (miR-16h, miR-29a, miR-103-2, miR-203) o cuartil más alto (let-7g, miR-10a, miR-181h) y el análisis de Kaplan Meier reveló que se encontró que altas proporciones T/N para cada uno eran indicativos de un mal pronóstico de supervivencia (Figura 8c-8i).

El análisis de regresión de Cox univariable y multivariable confirmó que altas proporciones T/N de cualquiera de estos miARN eran indicativos de un mal pronóstico de cáncer de colon independientemente de la estadificación TNM (Tabla 9). Los modelos de regresión de Cox multivariable que se ajustaron con respecto a edad, sexo, raza y estadificación TNM mostraron que altas proporciones T/N para miR-16b (RR = 5,1; p = 0,003), Jet-7g (RR = 2,5; p = 0,03), miR-10a (RR = 3,4; p = 0,003), miR-29a (RR = 3,2; p = 0,01), miR-103-2 (RR = 3,1; p = 0,01), miR-181h (RR = 3,2; p = 0,01) y miR-203 (RR = 3,2; p = 0,03) eran cada una predictiva de un mal pronóstico de supervivencia. Estos resultados sugieren que los pacientes con tumores que expresen altos niveles de cualquiera de estos miARN tienen un mayor riesgo de morir por cáncer de colon. Por lo tanto, los niveles de expresión de cualquiera de estos miARN pueden ser biomarcadores útiles que pueden ayudar a predecir riesgos de supervivencia para pacientes con cáncer de colon independientemente de la estadificación.

La firma de expresión de miARN de 9 miARNa predice el pronóstico de supervivencia:

Se usaron las proporciones T/N para los 9 miARN previamente mencionados para desarrollar una firma de miARN que pudiera usarse para predecir el pronóstico de cáncer de colon. Los individuos que no tenían más de 2 de 9 de estos valores se excluyeron de este análisis. Un grupo jerárquico de las proporciones T/N de los 9 miARN dio como resultado una agrupación de los 78 pacientes restantes en los dos grupos (Figura 9a).

Estos grupos tuvieron pronósticos de supervivencia significativamente diferentes (Figura 9b; p = 0,004). El análisis de regresión de Cox univariable (RR = 3,2, p = 0,008) y multivariable (RR = 2,8; p = 0,04) demostró que la firma de miARN estaba asociada con un mal pronóstico de supervivencia independientemente de la estadificación TNM (**Tabla 10**)

Tabla 10 – análisis de regresión de Cox de firma de microARN

Análisis univariable		
Variable	RR (IC 95 %)	valor p
9 miR Grupo B/A	3,2 (1,4 - 7,8)	0,008
Multivariable, ajuste por edad, sexo y raza		
Variable	RR (IC del 95 %)	valor p
9 miR Grupo B/A	2,8 (1,0 - 7,4)	0,043
edad >50/edad < 50	0,4 (0,08 - -1,8)	0,23
Hombre/Mujer	1,9 (0,6 - 6,6)	0,29
AA/Caucásica	0,9 (1,4 – 10,7)	0,82
Fase III-IV / Fase I - II	3,9 (1,4 - 10,7)	0,007

Se realizaron análisis de regresión de Cox univariable (parte superior) y multivariable (ajustado por edad, sexo, raza y estadificación; parte inferior) para demostrar que los individuos clasificados en el grupo B que usaban la firma de los 9 miARN tenían un mayor riesgo de morir por cáncer de colon. Ni la edad, ni el sexo, ni la raza contribuyeron significativamente al riesgo de supervivencia. Este riesgo asociado con la asignación de grupos es independiente de

la estadificación.

Estos resultados demuestran que las firmas de miARN pueden usarse como un biomarcador para predecir pronósticos de supervivencia de pacientes con cáncer de colon.

Discusión

Los miARN individuales se expresan diferencialmente en tumores de colon[12,13] lo que sugiere que la expresión modificada de estos miARN puede ser parte de los cambios celulares responsables de carcinogénesis de colon. Además de estos hallazgos, en el presente documento se demuestra que los perfiles de expresión de miARN están asociados con estadificación y pronóstico de cáncer de colon. Por lo tanto, los miARN, analizados individualmente o como parte de una firma de miARN, pueden usarse como biomarcadores que permitirán a los médicos predecir el riesgo de supervivencia de los pacientes con más precisión.

Las fuertes asociaciones con las proporciones T/N de miARN con un pronóstico de supervivencia sugieren que la expresión miARN modificada puede ser parte de una ruta causal en carcinogénesis y progresión de colon. Si la expresión alterada de cualquiera de estos miARN es causante de carcinogénesis, puede ser posible diseñar agentes farmacéuticos de tipo antagomir que pueden usarse para tratar el cáncer. Utilizando el perfilado de miARN y agentes terapéuticos basados en miARN, puede ser posible diseñar estrategias de tratamientos farmacológicos personalizadas basándose en cuáles de estos nueve miARN están modificados. Adicionalmente, estas estrategias pueden ser útiles en la prevención del cáncer de colon en personas que tienen un alto riesgo debido a un riesgo genéticamente heredado o historial previo de cáncer.

EJEMPLO 3

Métodos, reactivos y kits para diagnosticar, estadificar, pronosticar, controlar y tratar las enfermedades relacionadas con cáncer de colon.

En una realización, se proporciona un método de diagnóstico para evaluar si un paciente tiene una enfermedad relacionada con cáncer de colon o tiene un riesgo más elevado de lo normal para desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon que comprende las etapas de comparar el nivel de expresión de un marcador en una muestra del paciente y el nivel normal de expresión del marcador en un control, por ejemplo, una muestra de un paciente sin una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Un nivel significativamente más elevado de expresión del marcador en la muestra del paciente en comparación con el nivel normal es un indicativo de que el paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de colon o tiene un riesgo mayor de lo normal para desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

Los marcadores se seleccionan de tal manera que el valor predictivo positivo de los métodos es al menos aproximadamente del 10 %, y en determinadas relaciones no limitantes, aproximadamente del 25 %, aproximadamente del 50 % o aproximadamente del 90 %. También se prefiere para su uso en los métodos los marcadores que se expresan diferencialmente, en comparación con células normales, en al menos dos veces y en al menos aproximadamente el 20 % y en determinadas realizaciones no limitantes, aproximadamente el 50 % o aproximadamente el 75 %.

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

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

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

En determinados aspectos, los métodos de diagnóstico se dirigen a terapia usando un agente químico o biológico.

Estos métodos comprenden comparar: a) la expresión de un marcador en una primera muestra obtenida del paciente y conservada en presencia del agente químico o biológico, y b) la expresión del marcador en una segunda muestra obtenida del paciente y conservada en ausencia del agente. Un nivel significativamente inferior de expresión del marcador en la segunda muestra con respecto a la de la primera muestra es una indicación de que el agente es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el paciente. En una realización, la primera y segunda muestra pueden ser partes de una sola muestra obtenida del paciente o partes de muestras agrupadas obtenidas del paciente.

También se proporciona un método de control para evaluar la progresión de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente, comprendiendo el método: a) detectar en una muestra del paciente en un primer momento, la expresión de un marcador; b) repetir la etapa a) en un momento posterior en el tiempo; y c) comparar el nivel de expresión detectado en las etapas a) y b), y a partir de ahí controlar la progresión de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el paciente. Un nivel significativamente más alto de expresión del marcador en la muestra en el momento posterior del de la muestra en el primer momento es una indicación de que la enfermedad relacionada con cáncer de colon ha avanzado, mientras que un nivel de expresión significativamente inferior es una indicación de que la enfermedad relacionada con cáncer de colon ha remitido.

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

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

Adicionalmente se proporciona un método de ensayo para evaluar el posible daño de un compuesto ocasionando una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Este método comprende las etapas de: a) mantener las alícuotas separadas de células en presencia y ausencia del compuesto; y b) comparar la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas. Un nivel de expresión significativamente más alto del marcador en la alícuota mantenida en presencia del compuesto con respecto al de la alícuota mantenida en ausencia del compuesto es una indicación de que el compuesto posee dicho posible daño.

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

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

Cualquiera de los métodos anteriormente mencionados puede realizarse usando al menos uno o una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 5 o 10 o más) de marcadores de enfermedades relacionadas con cáncer de colon, incluyendo marcadores de enfermedades relacionadas con cáncer de colon.

En dichos métodos, el nivel de expresión en la muestra de cada uno de una pluralidad de marcadores, al menos uno de los cuales es un marcador, se compara con el nivel normal de expresión de cada uno de la pluralidad de marcadores en las muestras del mismo tipo obtenido a partir de humanos control que no padecen una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Un nivel de expresión significativamente modificado (es decir, aumentado o disminuido según se especifica en los métodos descritos anteriormente usando un solo marcador) en la muestra de uno o más marcadores, o alguna combinación de los mismos, con respecto al nivel de control o normal

correspondiente del marcador, es una indicación de que el paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Para todos los métodos mencionados anteriormente, el marcador (o marcadores) se selecciona de tal manera que el valor predictivo positivo del método sea al menos aproximadamente del 10 %.

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

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

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

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

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

En un amplio aspecto, se proporciona un método de producción del modelo animal que incluye: conservar al animal en un entorno específico libre de productos químicos y sensibilizar al animal con al menos un producto químico que se piensa que produce cáncer de colon. En determinadas realizaciones, al menos una parte del colon del animal se sensibiliza mediante exposiciones secuenciales múltiples.

En otro amplio aspecto, se proporciona un método para evaluar un agente con respecto a su eficacia contra al menos una enfermedad relacionada con cáncer de colon. El método generalmente incluye: administrar al menos un agente al animal, determinar si el agente reduce o agrava uno o más síntomas de la enfermedad relacionada con cáncer de colon; correlacionar una reducción en uno o más síntomas con la eficacia del agente contra la enfermedad relacionada con cáncer de colon; o correlacionar una ausencia de reducción en uno o más síntomas con ineficacia del agente.

El modelo animal es útil para evaluar una o más rutas metabólicas que contribuyen a al menos uno de iniciación, progresión, gravedad, patología, agresividad, grado, actividad, discapacidad, mortalidad, morbilidad, subclasificación de enfermedad u otras características patológicas o patogénicas subyacentes de al menos una enfermedad relacionada con cáncer de colon. El análisis puede ser mediante uno o más de: agrupamiento jerárquico, construcción de redes de firma, análisis proteómico de espectroscopia de masas, resonancia de plasmón superficial, modelo estadístico lineal, análisis discriminatorio de mínimos cuadrados parciales y análisis de regresión lineal múltiple.

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

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado al normalmente entendido por un experto habitual en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Las técnicas

convencionales se usan para métodos moleculares, genéticos y bioquímicos que se encuentran dentro del ámbito de la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Mullis *et al*. Patente de Estados Unidos Nº 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (Hames & Higgins eds., 1984); Transcription And Translation (Hames & Higgins eds., 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu *et al*. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Waker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986); The Laboratory Rat, editor jefe: Mark A. Suckow; autores: Sharp y LaRegina. CRC Press, Boston, 1988, que se incorporan en el presente documento por referencia) y métodos químicos.

En el presente documento se describen nuevos marcadores descubiertos asociados con un estado inducido por cáncer de colon de diversas células. Se ha descubierto que el nivel de expresión más alto en comparación con el normal de cualquiera de estos marcadores o combinación de estos marcadores se correlaciona con la presencia de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente. Se proporcionan métodos para detectar la presencia de una enfermedad de cáncer de colon en una muestra; la ausencia de a en una muestra; el estado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon y otras características de una enfermedad relacionada con cáncer de colon que son relevantes para la evaluación, prevención, diagnóstico, caracterización y terapia de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente. También se proporcionan métodos de tratamiento de una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

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

Los artículos “un”, “una” y “uno” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Como ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

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

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

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

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

Un kit es cualquier fabricación (por ejemplo un envase o recipiente) que comprenda al menos un reactivo, por ejemplo, una sonda, para detectar específicamente la expresión de un marcador. El kit puede facilitarse, distribuirse o comercializarse como una unidad para realizar los métodos de la presente invención.

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

Las composiciones, kits y métodos descritos en el presente documento tienen los siguientes usos, entre otros: 1) evaluar si un paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de colon; 2) evaluar la fase de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente humano; 3) evaluar el grado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 4) evaluar la naturaleza de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 5) evaluar el potencial para desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 6) evaluar el tipo histológico de células asociado con una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 7) preparar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o derivados de anticuerpos que sean útiles para

el tratamiento de una enfermedad relacionada con cáncer de colon y/o evaluar si un paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de colon; 8) evaluar la presencia de células de enfermedades relacionadas con cáncer de colon, 9) evaluar la eficacia de uno o más compuestos de ensayo para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente, 10) evaluar la eficacia de una terapia para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 11) controlar el avance de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 12) seleccionar una composición o terapia para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 13) tratar a un paciente que padece una enfermedad relacionada con cáncer de colon; 14) inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente; 15) evaluar el posible daño de un compuesto de ensayo; y 16) prevenir la aparición de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente que está en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

Métodos de exploración

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

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

Los agente candidatos se obtienen a partir de una amplia diversidad de fuentes incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Existen, por ejemplo, numerosos medios disponibles para la síntesis al azar y dirigida de una amplia serie de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales se encuentran disponibles o se producen fácilmente. De manera adicional, las bibliotecas producidas de manera natural o sintética y los compuestos se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. En determinadas realizaciones, los agentes candidatos pueden obtenerse usando cualquiera de las numerosas estrategias en la técnica de los métodos de bibliotecas combinatorias, que incluyen, como ejemplo no limitante:

bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase en solución o fase sólida espacialmente dirigibles en paralelo; métodos de biblioteca sintéticos que requieren la desconvolución; el método de biblioteca “una perla un compuesto”; y métodos de biblioteca sintéticos utilizando selección por cromatografía de afinidad.

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

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

El agente candidato puede ser un agente que regule positiva o negativamente una o más rutas de respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon. En determinadas realizaciones, el agente candidato puede ser un antagonista que influya en dicha ruta.

Métodos para tratar una enfermedad relacionada con cáncer de colon

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar, inhibir, aliviar o invertir una respuesta de una enfermedad relacionada con cáncer de colon. En los métodos descritos en el presente documento, un agente que interfiere con una cascada de señalización se administra a un individuo que lo necesite, tal como, pero sin limitación, pacientes con una enfermedad relacionada con cáncer de colon en los que dichas complicaciones aún no se han

manifestado y aquellos que ya han padecido una respuesta de enfermedad relacionada con cáncer de colon.

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

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

Expresión de un marcador

La expresión de un marcador puede inhibirse de diversas maneras, incluyendo, como ejemplo no limitante, un oligonucleótido antisentido que puede proporcionarse a las células con enfermedad relacionada con cáncer de colon para inhibir la transcripción, traducción, o ambas, del marcador (o marcadores). Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una proteína marcadora, y unido operativamente a una región promotora/reguladora apropiada, puede proporcionarse a la célula para generar anticuerpos intracelulares que inhibirán la función o actividad de la proteína. La expresión y/o función de un marcador también puede inhibirse tratando la célula de enfermedad relacionada con cáncer de colon con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una proteína marcadora. Utilizando los métodos descritos en el presente documento, una diversidad de moléculas, particularmente incluyendo moléculas suficientemente pequeñas para ser capaces de atravesar la membrana celular, pueden explorarse para identificar moléculas que inhiban la expresión de un marcador o inhiban la función de una proteína marcadora. El compuesto así identificado puede proporcionarse al paciente para inhibir las células con enfermedad relacionada con cáncer de colon del paciente.

Cualquier marcador o combinación de marcadores, así como cualquiera de los marcadores determinados en combinación con los marcadores, pueden usarse en las composiciones, kits y métodos descritos en el presente documento. En general, es deseable el uso de marcadores para los cuales la diferencia entre el nivel de expresión del marcador en las células con enfermedad relacionada con cáncer de colon y el nivel de expresión del mismo marcador en células sistémicas de colon normal es tan grande como sea posible. Aunque esta diferencia puede ser tan pequeña como el límite de detección del método para evaluar la expresión del marcador, es deseable que la diferencia sea al menos mayor que el error típico del método de evaluación y, en determinadas realizaciones, una diferencia de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 100, 500, 1000 veces o mayor que el nivel de expresión del mismo marcador en tejido normal.

Se reconoce que determinadas proteínas marcadoras se secretan en el espacio extracelular que rodea las células. Estos marcadores pueden usarse en determinadas realizaciones de las composiciones, kits y métodos, debido al hecho de que dichas proteínas marcadoras pueden detectarse en una muestra de líquido corporal asociada con cáncer de colon, que puede recogerse más fácilmente de un paciente humano en comparación con una muestra de biopsia tisular. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína marcadora incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto pueda detectarse mediante técnicas de formación de imágenes convencionales.

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

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

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

Las composiciones, kits y métodos pueden usarse para detectar la expresión de proteínas marcadoras que tengan al menos una parte que se presenta sobre la superficie de células que la expresen. Por ejemplo, pueden usarse métodos inmunológicos para detectar dichas proteínas en células enteras, o métodos de análisis de secuencia basados en ordenador para predecir la presencia de al menos un dominio extracelular (es decir, incluyendo proteínas secretadas y proteínas que tienen al menos un dominio de superficie celular). La expresión de una

proteína marcadora que tiene al menos una parte que se presenta sobre la superficie de una célula que la exprese puede detectarse sin someter necesariamente a la célula a lisis (por ejemplo, usando un anticuerpo marcador que se una específicamente con un dominio de superficie celular de la proteína).

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

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

En otra realización particular, la expresión de un marcador se evalúa preparando ARNm/ADNc (es decir un polinucleótido transcrito) de células en una muestra del paciente e hibridando el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complemento de un ácido nucleico marcador o un fragmento del mismo. Opcionalmente, el ADNc puede amplificarse usando cualquiera de una diversidad de métodos de reacción en cadena de la polimerasa antes de la hibridación con el polinucleótido de referencia; preferentemente, este no está amplificado. La expresión de uno o más marcadores puede probablemente detectarse usando PCR cuantitativa para evaluar el nivel de expresión del marcador (o marcadores). Como alternativa, cualquiera de los muchos métodos de detección de mutaciones o variantes (por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido, deleciones, etc.) de un marcador puede usarse para detectar la aparición de un marcador en un paciente.

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

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

En determinadas realizaciones, la etapa de determinación comprende un ensayo seleccionado de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos basados en fluorescencia y ensayos de ultra alto rendimiento, por ejemplo resonancia de plasmón superficial (RPS) o ensayos de espectroscopia de correlación con fluorescencia (FCS). En dichas realizaciones, el detector SPR es útil para dirigir la observación en tiempo real de interacciones biomoleculares dado que el SPR es sensible a cambios en cuanto al índice de refracción mínimo en una superficie metálica dieléctrica. SPR es una técnica de superficie que es sensible a cambios de unidades de índice refractario (IR) de 10^5 a 10^{-6} aproximadamente a 200 nm de la interfaz detector/muestra de SPR. Por lo tanto, la espectroscopia SPR es útil para controlar el crecimiento de finas películas orgánicas depositadas en la capa sensora.

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

Se entiende que la exploración rutinaria de muestras de paciente adicional usando uno o más de los marcadores se realizará de manera que algunos de los marcadores se sobreexpresen en células de diversos tipos incluyendo enfermedades relacionadas con cáncer de colon.

Además, a medida que un mayor número de muestras de pacientes se evalúa para la expresión de los marcadores y los resultados de los pacientes individuales de cuyas muestras se obtienen se correlacionan, se confirmará también que la expresión modificada de determinados marcadores se correlaciona fuertemente con una enfermedad relacionada con cáncer de colon y que la expresión modificada de los otros marcadores se correlaciona fuertemente con otras enfermedades. Las composiciones, kits y métodos son por tanto útiles para caracterizar uno o más de fase, grado, tipo histológico y naturaleza de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en pacientes.

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

Cuando en las composiciones, kits y métodos se utiliza una pluralidad de marcadores, el nivel de expresión de cada marcador en una muestra del paciente puede compararse con el nivel normal de expresión de cada una de la pluralidad de marcadores en las muestras que no son de cáncer de colon del mismo tipo, en una sola mezcla de reacción (es decir usando reactivos, tales como diferentes sondas fluorescentes para cada marcador) o en mezclas de reacción individuales correspondientes a uno o más de los marcadores. En una realización, un nivel significativamente aumentado de expresión de uno o más de la pluralidad de marcadores en la muestra con respecto a los niveles normales correspondientes, es una indicación de que el paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Cuando se usa una pluralidad de marcadores, pueden usarse 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 20, 30 o 50 o más marcadores individuales; en determinadas realizaciones, puede desearse el uso de menos marcadores.

Para maximizar la sensibilidad de las composiciones, kits y métodos (es decir por interferencia atribuible a células de origen sistémico no de colon en una muestra de paciente), es deseable que el marcador utilizado en ellos sea un marcador que tenga una distribución tisular limitada, por ejemplo, que normalmente no se exprese en un tejido de sistema que no sea de colon.

Se reconoce que las composiciones, kits y métodos serán de particular utilidad para pacientes que tengan un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon y para sus asesores médicos. Los pacientes que se reconoce que tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon incluyen, por ejemplo, pacientes que tienen un historial familiar de una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

El nivel de expresión de un marcador en tejido sistémico de colon humano normal puede evaluarse de diversas maneras. En una realización, este nivel de expresión normal se evalúa evaluando el nivel de expresión del marcador en una parte de las células sistémicas de colon que parecen ser normales y comparando este nivel normal de expresión con el nivel de expresión en una parte de las células sistémicas de colon que se sospecha que es anómalo. Como alternativa, y particularmente como información adicional disponible como resultado de realización rutinaria de los métodos descritos en el presente documento, pueden usarse valores promedios de la población para la expresión normal de los marcadores. En otras realizaciones, el nivel “normal” de expresión de un marcador puede determinarse evaluando la expresión del marcador en una muestra de paciente obtenida de un paciente que no padece un cáncer de colon, procedente de una muestra de un paciente obtenida de un paciente antes de la sospechada aparición de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el paciente, de muestras de pacientes archivadas y similares.

También se proporcionan en el presente documento composiciones, kits y métodos para evaluar la presencia de células con enfermedad relacionada con cáncer de colon en una muestra (por ejemplo, una muestra tisular archivada o una muestra observada de un paciente). Estas composiciones, kits y métodos son sustancialmente los mismos a los descritos anteriormente, excepto que, cuando sea necesario, las composiciones, kits y métodos están adaptadas para su uso con muestras distintas de muestras de pacientes. Por ejemplo, cuando la muestra a usar es una muestra tisular humana archivada, parafinada, puede ser necesario ajustar la relación de compuestos en las composiciones, en los kits o los métodos usados para evaluar los niveles de expresión de marcadores en la muestra.

Kits y reactivos

Los kits son útiles para evaluar la presencia de células de enfermedades relacionadas con cáncer de colon (por ejemplo en una muestra tal como una muestra del paciente). El kit comprende una pluralidad de reactivos, cada uno de los cuales puede unirse específicamente con un ácido nucleico o una proteína marcadora. Los reactivos adecuados para unirse con una proteína marcadora incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y similares. Los reactivos adecuados para unirse con un ácido nucleico marcador (por ejemplo un ADN genómico, un ARNm, un ARNm de corte y empalme, un ADNc o similares) incluyen ácidos nucleicos complementarios. Por ejemplo, los reactivos de ácidos nucleicos pueden incluir oligonucleótidos (marcados o no

marcados) unidos a un sustrato, oligonucleótidos marcados no unidos a un sustrato, pares de cebadores de PCR, sondas moleculares, y similares.

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

Método de producción de anticuerpos

En el presente documento también se proporciona un método para fabricar un hibridoma aislado que produzca un anticuerpo útil para evaluar si un paciente padece una enfermedad relacionada con cáncer de colon. En este método, una proteína o un péptido que comprenda todo o un segmento de una proteína marcadora se sintetiza o se aísla (por ejemplo, mediante purificación de una célula en la cual esta se expresa o por transcripción y traducción de un ácido nucleico que codifica la proteína o péptido *in vivo* o *in vitro*). Un vertebrado, por ejemplo, un mamífero tal como un ratón, rata, conejo u oveja, se inmuniza usando la proteína o el péptido. Opcionalmente (y preferentemente) el vertebrado puede inmunizarse al menos una vez más con la proteína o péptido, de tal manera que el vertebrado presente una fuerte respuesta inmunitaria contra la proteína o péptido. Se aíslan esplenocitos del vertebrado inmunizado y se fusionan con una línea celular inmortalizada para formar hibridomas, usando cualquiera de una diversidad de métodos. Los hibridomas formados de esta manera se exploran después usando métodos convencionales para identificar uno o más hibridomas que produzcan un anticuerpo que se una específicamente con la molécula marcadora o un fragmento de la misma. En el presente documento también se proporcionan hibridomas fabricados mediante este método y anticuerpos fabricados usando dichos hibridomas.

Método para evaluar la eficacia

En el presente documento también se proporciona un método para evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo para inhibir células con enfermedad relacionada con cáncer de colon. Como se ha descrito anteriormente, las diferencias en el nivel de expresión de los marcadores se correlacionan con el estado anómalo de las células sistémicas de colon. Aunque se reconoce que los cambios en los niveles de expresión de determinados marcadores probablemente resulten del estado anómalo de las células sistémicas de colon, es probable que se reconozca que estos cambios en los niveles de expresión de otros de los marcadores induzcan, mantengan y promuevan el estado anómalo de estas células. Por lo tanto, los compuestos que inhiben una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un paciente provocarán que el nivel de expresión de uno o más de los marcadores cambie a un nivel más cercano al nivel normal de expresión de ese marcador (es decir, el nivel de expresión del marcador en células sistémicas de colon normales).

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

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

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

Como se describe en el presente documento, el estado anómalo de células de colon humanas se correlaciona con cambios en los niveles de expresión de los marcadores. También se proporciona un método para evaluar el posible daño de un compuesto de ensayo. Este método comprende mantener alícuotas individuales de células de colon

humano en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo. Se compara la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas. Un nivel de expresión significativamente más alto de un marcador en la alícuota mantenida en presencia del compuesto de ensayo (con respecto a la alícuota mantenida en ausencia del compuesto de ensayo) es una indicación de que el compuesto de ensayo posee un posible daño. El posible daño relativo de diversos compuestos de ensayo puede evaluarse comparando el grado de mejora o inhibición del nivel de expresión de los marcadores relevantes, comparando el número de marcadores para los cuales el nivel de expresión se mejora o inhibe, o comparando ambos.

A continuación se describen diversos aspectos con mayor detalle en las siguientes subsecciones.

Proteínas y anticuerpos aislados

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

Una proteína “aislada” o “purificada” o una parte biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular a partir de la cual deriva la proteína o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de proteína en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se producen recombinantemente. Por tanto, la proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de proteína heteróloga (denominado en el presente documento también como una “proteína contaminante”).

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

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

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

Medicina predictiva

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

relacionada con cáncer de colon.

En otro aspecto, los métodos son útiles durante al menos una exploración periódica del mismo individuo para observar si ese individuo se ha expuesto a productos químicos o toxinas que cambian sus modelos de expresión.

Otro aspecto adicional se refiere al control de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos u otros compuestos administrados bien para inhibir una enfermedad relacionada con cáncer de colon o para tratar o prevenir cualquier otro trastorno (por ejemplo, para entender cualquier efecto sistémico que dicho tratamiento pueda tener) sobre la expresión o actividad de un marcador en ensayos clínicos.

Farmacogenómica

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

Ensayos clínicos de control

El control de la influencia de agentes (por ejemplo, compuestos farmacológicos) sobre el nivel de expresión de un marcador puede aplicarse no solo en exploración basada en fármacos, sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente que afecte a la expresión de un marcador puede controlarse en ensayos clínicos de sujetos que reciben tratamiento para una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

En una realización no limitante, también se desvela un método para controlar la eficacia de tratamiento de un sujeto, con un agente (por ejemplo un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, pequeña molécula u otro fármaco candidato) que comprende las etapas de (i) obtener una muestra de preadministración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de uno o más marcadores seleccionados en la muestra de preadministración; (iii) obtener una o más muestras postadministración del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión del marcador (o marcadores) en las muestras postadministración; (v) comparar el nivel de expresión del marcador (o marcadores) en la muestra de preadministración con el nivel de expresión del marcador o (marcadores) en la muestra o muestras postadministración; y (vi) modificar teniendo en cuenta esto la administración del agente al sujeto.

Por ejemplo, una mayor expresión de un gen (o genes) marcador durante el transcurso del tratamiento puede indicar una dosificación ineficaz y la idoneidad de aumentar la dosificación. A la inversa, una menor expresión del gen (o genes) marcador puede indicar un tratamiento eficaz y que no se requiere el cambio de dosificación.

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

Como se usa en el presente documento, "medios legibles por aparatos electrónicos" se refiere a cualquier medio adecuado para almacenar, dar soporte o incluir datos o información que puede leerse y a la cual puede accederse directamente mediante un aparato electrónico. Dichos medios pueden incluir, pero sin limitación: medios de almacenamiento magnético, tales como disquetes, medios de almacenamiento en disco duro y cintas magnéticas; medios de almacenamiento óptico tal como disco compacto; medios de almacenamiento electrónico tal como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares; y discos duros generales e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnético/óptico. El medio está adaptado o configurado para registrar en él un marcador como se describe en el presente documento.

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

Como se usa en el presente documento, "registrado" se refiere a un proceso para conservar o codificar información en el medio legible con el aparato electrónico. Los expertos en la técnica pueden adoptar fácilmente cualquier método para registrar información sobre medios para generar materiales que comprenden los marcadores descritos en el presente documento.

Puede usarse diversos programas informáticos y formatos para almacenar la información marcadora de la presente

invención en el medio legible por aparato electrónico. Puede emplearse cualquier cantidad de formatos estructurales de procesadores de datos (por ejemplo, archivos de texto o bases de datos) para obtener o crear un medio que tenga registrado en él los marcadores. Proporcionando los marcadores en forma legible, puede accederse rutinariamente a la información de secuencia del marcador para diversos fines. Por ejemplo, un experto en la técnica puede usar las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos en forma legible para comparar una secuencia diana o un motivo estructural diana con la información de secuencia almacenada dentro del medio de almacenamiento de datos. Los medios de búsqueda se usan para identificar fragmentos o regiones de las secuencias que coinciden con una secuencia diana o motivo diana particular.

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

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

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

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

En el presente documento también se proporciona una matriz que puede usarse para evaluar la expresión de uno o más genes en la matriz. En una realización, la matriz puede usarse para evaluar la expresión génica en un tejido para determinar la especificidad tisular de genes en la matriz. De esta manera, puede evaluarse la expresión de hasta aproximadamente 7000 o más genes simultáneamente. Esto permite desarrollar un perfil que muestre una batería de genes que se expresan específicamente en uno o más tejidos.

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

Dicha determinación es útil, por ejemplo, para conocer el efecto de la interacción célula-célula a nivel de la expresión génica. Si un agente se administra terapéuticamente para tratar un tipo de célula pero tiene un efecto no deseable sobre otro tipo de célula, el método proporciona un ensayo para determinar la base molecular del efecto indeseable y por tanto proporciona la oportunidad de coadministrar un agente neutralizador o de otra manera tratar el efecto indeseado. De manera similar, incluso dentro de un único tipo celular, los efectos biológicos indeseables pueden

determinarse a nivel molecular. Por tanto, los efectos de un agente sobre la expresión de otro gen distinto del diana pueden determinarse y contrarrestarse.

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

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

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

Marcadores sustitutos

Los marcadores pueden servir como marcadores sustitutos para uno más trastornos o patologías o para afecciones que conducen a una patología relacionada con cáncer de colon. Como se usa en el presente documento, un "marcador sustituto" es un marcador bioquímico objetivo que se correlaciona con la ausencia o con la presencia de una enfermedad o un trastorno, o con la progresión de una enfermedad o un trastorno. La presencia o cantidad de dichos marcadores es independiente de la enfermedad. Por tanto, estos marcadores pueden servir para indicar si un transcurso particular de tratamiento es eficaz en la disminución de una patología o trastorno. Los marcadores sustitutos son de particular uso cuando la presencia o grado de una patología o trastorno es difícil de evaluar a través de metodologías convencionales o cuando se desea una evaluación de progresión de enfermedad antes de conseguir un criterio de valoración clínico posiblemente peligroso.

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

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

Protocolos de ensayo

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

Cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento y el nivel de expresión se expresa diferencialmente (por ejemplo, es más alto o más bajo que en el control), se considera que el sujeto padece una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Cuando el nivel de expresión del gen marcador se encuentra dentro del intervalo permisible, el sujeto probablemente no padece ninguna enfermedad relacionada con cáncer de colon.

El valor patrón para el control puede pre-determinarse midiendo en el control el nivel de expresión del gen marcador, para comparar los niveles de expresión. Por ejemplo, el valor patrón puede determinarse basándose en el nivel de expresión del gen marcador mencionado anteriormente en el control. Por ejemplo, en determinadas relaciones, el intervalo permisible se toma como ± 2 D.T. basándose en el valor patrón. Una vez determinado el valor patrón, el

método de ensayo puede realizarse midiendo solo el nivel de expresión en una muestra biológica procedente de un sujeto y comparando el valor con el valor patrón determinado para el control.
Los niveles de expresión de los genes marcadores incluyen la transcripción de los genes marcadores a ARNm, y la traducción a proteínas. Por lo tanto, un método para evaluar una enfermedad relacionada con cáncer de colon se realiza basándose en una comparación de la intensidad de expresión de ARNm correspondiente a los genes marcadores, o del nivel de expresión de las proteínas codificadas por los genes marcadores.

La medición de los niveles de expresión de los genes marcadores en el ensayo de una enfermedad relacionada con cáncer de colon puede realizarse de acuerdo con diversos métodos de análisis de genes. Específicamente, puede usarse, por ejemplo, una técnica de hibridación que, como sonda, utilice ácidos nucleicos que se hibriden con estos genes, o una técnica de amplificación de genes que, como cebador, utilice ADN que se hibride con los genes marcadores.

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

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

También debe entenderse que los genes marcadores pueden incluir homólogos de otras especies además de los de seres humanos. Por tanto, salvo que se especifique de otra manera, la expresión “gen marcador” se refiere a un homólogo del gen marcador exclusivo para la especie o un gen marcador exógeno que se ha introducido en un individuo.

Además, debe entenderse que, un “homólogo de un gen marcador” se refiere a un gen derivado de una especie distinta de la del ser humano que, en condiciones rigurosas, puede hibridarse con el gen marcador humano como una sonda. Dichas condiciones rigurosas son conocidas para un experto en la técnica que puede seleccionar una condición apropiada para producir, de manera experimental o empírica, una condición de rigurosidad idéntica.

Como cebador o sonda puede utilizarse un polinucleótido que comprenda la secuencia de nucleótidos de un gen marcador o una secuencia de nucleótidos que sea complementaria a la cadena complementaria de la secuencia de nucleótidos de un gen marcador y que tenga una longitud de al menos 15 nucleótidos. Por tanto, una “cadena complementaria” significa una cadena de un ADN bicatenario con respecto a la otra cadena y que está compuesta por pares de bases de A:T (U para ARN) y G:C.

Además, “complementario” no solo significa que sea completamente complementario a una región de al menos 15 nucleótidos contiguos, sino también que tenga una homología de secuencia de nucleótidos de al menos el 40 % en casos determinados, el 50 % en casos determinados, el 60 % en casos determinados, el 70 % en casos determinados, al menos el 80 %, el 90 % y el 95 % o más. El grado de homología entre secuencias de nucleótidos puede determinarse mediante un algoritmo, BLAST, etc.

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

Los “polinucleótidos” pueden ser de ADN o de ARN. Estos polinucleótidos pueden producirse de manera sintética o natural. Además, normalmente el ADN utilizado como una sonda para la hibridación está marcado. Los expertos en la técnica conocen bien dichos métodos de marcado. En el presente documento, el término “oligonucleótido” significa un polinucleótido con un grado de polimerización relativamente bajo. Los oligonucleótidos se incluyen en los polinucleótidos.

Utilizando técnicas de hibridación pueden realizarse ensayos para detectar una enfermedad relacionada con cáncer de colon, utilizando, por ejemplo, la hibridación de Northern, la hibridación por transferencia puntual, o la técnica de micromatriz de ADN. Además, pueden usarse técnicas de amplificación de genes, tales como el método RT-PCR. Usando el método de control de amplificación por PCR durante la etapa de amplificación de genes en la RT-PCR, puede conseguirse un análisis más cuantitativo de la expresión de un gen marcador.

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

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

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

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

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

Incluso si a un paciente no se le ha diagnosticado una enfermedad relacionada con cáncer de colon en un ensayo rutinario a pesar de los síntomas que sugieren estas enfermedades, realizando un ensayo de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, puede determinarse fácilmente si el paciente padece o no una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

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

Además, los ensayos son útiles para determinar si una enfermedad relacionada con cáncer de colon está mejorando en un paciente. En otras palabras, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para evaluar el efecto terapéutico de un tratamiento para una enfermedad relacionada con cáncer de colon. Además, cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento, un aumento o una disminución en el nivel de expresión del gen marcador en un paciente, al cual se le ha diagnosticado que está afectado por una enfermedad relacionada con cáncer de colon, implica que la enfermedad ha avanzado más.
La gravedad y/o susceptibilidad a una enfermedad relacionada con cáncer de colon también puede determinarse basándose en la diferencia en los niveles de expresión. Por ejemplo, cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento, el grado de aumento en el nivel de expresión del gen marcador está correlacionado con la presencia y/o gravedad de una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

Modelos animales

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

El modelo animal para una enfermedad relacionada con cáncer de colon es útil para detectar cambios fisiológicos

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

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, la expresión “un aumento en el nivel de expresión” se refiere a uno cualquiera de los siguientes: cuando un gen marcador introducido como un gen exógeno se expresa artificialmente; cuando la transcripción de un gen marcador intrínseco al animal sujeto y su traducción en la proteína están potenciadas; o cuando la hidrólisis de la proteína, que es el producto de traducción, está suprimida. Como se usa en el presente documento, la expresión “una disminución en el nivel de expresión” se refiere al estado en el que se inhibe la transcripción de un gen marcador del animal sujeto y la traducción del mismo en la proteína, o el estado en el que se potencia la hidrólisis de la proteína, que es el producto de traducción. El nivel de expresión de un gen puede determinarse, por ejemplo, por una diferencia en la intensidad de señal en una microplaca de ADN. Además, la actividad del producto de traducción -la proteína- puede determinarse por comparación con la del estado normal.

También está en el ámbito contemplado, que el modelo animal pueda incluir animales transgénicos, incluyendo, por ejemplo, animales en los que se ha introducido y expresado artificialmente un gen marcador; animales con genes marcadores desactivados (*knockout*), y animales con genosustituciones (*knock-in*) en los que otro gen se ha sustituido por un gen marcador. Como animal transgénico puede utilizarse un animal transgénico, en el que se ha introducido un ácido nucleico antisentido de un gen marcador, una ribozima, un polinucleótido que tiene un efecto de ARNi, o un ADN que actúa como un ácido nucleico señuelo. Dichos animales transgénicos también incluyen, por ejemplo, animales en los que se ha potenciado o suprimido la actividad de una proteína marcadora introduciendo una mutación (o mutaciones) en la región codificante del gen, o la secuencia de aminoácidos se ha modificado para hacerse resistente y susceptible a hidrólisis. Las mutaciones en una secuencia de aminoácidos incluyen sustituciones, deleciones, inserciones y adiciones.

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

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

Se entiende que la expresión “un compuesto que aumenta el nivel de expresión de un gen” se refiere a un compuesto que promueve una cualquiera de las etapas de la transcripción génica, traducción génica, o expresión de una actividad de proteína. Por otro lado, la expresión “un compuesto que disminuya el nivel de expresión de un gen”, como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que inhibe una cualquiera de estas etapas.

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

En otro aspecto adicional, en el presente documento se proporciona un método para evaluar la eficacia de un compuesto candidato para un agente farmacéutico sobre el nivel de expresión de un gen (o genes) marcador poniendo en contacto un sujeto animal con el compuesto candidato y controlando el efecto del compuesto sobre el nivel de expresión del gen (o genes) marcador en una muestra biológica derivada del sujeto animal. La variación en el nivel de expresión del gen (o genes) marcador en una muestra biológica derivada del sujeto animal puede controlarse usando la misma técnica que la usada en el método de ensayo descrito anteriormente. Además, basándose en la evaluación, mediante identificación puede seleccionarse un compuesto candidato para un agente farmacéutico.

Aunque la invención se ha descrito e ilustrado con suficiente detalle para que los expertos en esta técnica puedan realizarla y utilizarla, diversas alternativas, modificaciones y mejoras pueden ser obvias sin alejarse del ámbito de la invención. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención se adapta bien para realizar los objetos y obtener las finalidades y ventajas mencionadas, así como aquellas que son internamente intrínsecas.

Los métodos y reactivos descritos en el presente documento son representativos de realizaciones preferidas, son ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención. Los expertos en la técnica realizarán modificaciones internas y las darán otros usos. Estas modificaciones se incluyen en el espíritu de la invención y se definen en el ámbito de las reivindicaciones. También será muy obvio para un experto en la técnica que puedan realizarse diversas sustituciones y modificaciones en la invención descrita sin alejarse de su ámbito.

Debe entenderse que, aunque la presente invención se ha descrito específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, un experto en la técnica puede recurrir a modificaciones y a variaciones de los conceptos descritos en el presente documento y se considera que dichas modificaciones o variaciones están dentro del ámbito de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REFERENCIAS DEL EJEMPLO 1

1. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon Oxford: IARC Press; 2000:104-19.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 2007; 57 (1) : 43- 66.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61(5): 75967.
4. Goldman E, Fisher JL. Discrepancies in cancer mortality estimates. Arch Med Res 2006; 37 (4): 548- 51.
5. Rodriguez-Bigas MA, HoffP, Crane CH. Carcinoma of the Colon and Rectum. In: Kufe DW, Bast RC, Hait WN, et al., eds. Holland-Frei Cancer Medicine 7. 7th ed. Hamilton, Ont: BC Decker Inc; 2006: 1369-91.
6. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2006; 6 (11): 859- 66.
7. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2005; 353 (17): 1793- 801.
8. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 2006; 9 (3): 189- 98.
9. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116 (2): 281- 97.
10. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin- 4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin- 14. Cell 1993; 75 (5): 843- 54.
11. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin- 14 by lin- 4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 1993; 75 (5): 855- 62.
12. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. Cell 2003; 113(0: 25-36.
13. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA- 21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res 2005; 65 (14): 6029- 33.
14. Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The Drosophila microRNA Mir- 14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. Curr Biol 2003; 13 (9): 790- 5.
15. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science 2004; 303 (5654): 83- 6.
16. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature 2005; 435 (7043): 828- 33.
17. Esquela- Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs- microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer 2006; 6 (4): 259-

69.
18. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005; 435 (7043): 834- 8.
19. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103 (7): 2257- 61.
20. Cummins JM, He Y, Leary RJ, et al. The colorectal microRNAome. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103 (10): 3687- 92.
21. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. Mol Cancer 2006; 5: 29,
22. Michael MZ, SM OC, van Hoist Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. Mol Cancer Res 2003; 1 (12): 882- 91.
23. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down- regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99 (24): 15524- 9.
24. Dews M, Homayouni A, Yu D, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc- activated microRNA cluster. Nat Genet 2006; 38 (9): 1060- 5.
25. Wang CL, Wang BB, Bartha G, et al. Activation of an oncogenic microRNA cistron by provirus integration. Proo Natl Acad Sci U S A 2006; 103(49): 18680-4.
26. Georgantas RW, 3rd, Hildreth R, Morisot S, et al. CD34+ hematopoietic stem- progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104 (8): 2750-5.
27. Chen Y, Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. Cancer Res 2007; 67 (3): 976- 83.
28. Wurdinger T, Costa FF. Molecular therapy in the microRNA era. Pharmacogenomics J 2006.
29. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagom irs'. Nature 2005; 438 (7068): 685- 9.
30. Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome- wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101 (26): 9740- 4.
31. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. Dis Colon Rectum 2005:48(6):11618.
32. Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. J Mol Biol 2004; 339 (2) : 327- 35.
33. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer Res 2005; 65(21): 962832.
34. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res 2005; 65 (16): 7065- 70.
35. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR- 21- mediated tumor growth. Oncogene 2007; 26 (19): 2799-803.
36. Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro- RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. Gastroenterology 2006; 130 (7): 2113- 29.
37. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA- 21 Targets the Tumor Suppressor Gene Tropomyosin 1 (TPMI). J Biol Chem 2007; 282 (19): 14328- 36.
38. Brosens LA, van Hattem WA, Jansen M, de Leng WW, Giardiello FM, Offerhaus GJ. Gastrointestinal polyposis syndromes. Curr Mol Med 2007; 7 (1): 29- 46.
39. Mattes J, Yang M, Foster PS. Regulation ofmicroRNA by antagomirs: a new class of pharmacological antagonists for the specific regulation of gene function? Am J Respir Cell Mol Biol 2007; 36 (1): 8- 12.

REFERENCIAS DEL EJEMPLO 2

1. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2006.
2. Bartel, D. P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 2004. 116(2): p. 281-97.
3. Esquela-Kerscher, A. and F. J. Slack, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer, 2006. 6(4): p. 259-69.
4. Brennecke, J., D. R. Hipfner, A. Stark, R. B. Russell, y S. M. Cohen, bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila, Cell, 2003.113(1): p. 25-36.
5. Chan, J. A., A. M. Krichevsky, y K. S. Kosik, MicroRNA-21 is an antiapoptotic, factor in human glioblastoma cells. Cancer Res, 2005. 65(14): p. 6029-33.
6. Xu, P., S. Y. Vemooy, M. Guo, y B. A. Hay, The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal/at metabolism. Curr Biol, 2003. 13(9): p. 790-5.
7. Lee, R. C., R. L. Feinbaum, y V. Ambros, The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarily to lin-14. Cell, 1993. 75(5): p. 843-54.
8. Wightman, B., I. Ha, y G. Ruvkun, Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell, 1993. 75(5): p. 855-62.
9. Chen, C. Z., L. Li, H. F. Lodish, y D. P. Bartel, Micro-RNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science, 2004. 303(5654): p. 83-6.
10. He, L., J, M. Thomson, M, T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon, y S. M. Hammond, A microRNA polycistron as a potential human oncogene.

Nature,
2005. 435(7043): p. 828-33.
11. Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R.H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, y T. R. Golub, MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature, 2005. 435(7043): p, 834-8.
12. Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Arabs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchlone, M. Negrini, C. C. Harris, y C. M. Croce, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(7): p. 2257-61.
13. Cummins, J. M., Y. He, R. J. Leary, R. Pagliarini, L, A. Diaz, Jr., T. Sjoblom, O. Barad, Z. Bentwich, A. E. Szafranska, E. Labourier, C. K. Raymond, B. S. Roberts, H. Juhl, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, y V. E. Velculescu, The colorectal microRNAome. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(10): p. 3687-92.
14. Cahn, G. A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, y C. M. Croce, A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, 2005. 353(17): p. 1793-801.
15. Yanaihara, N., N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R. M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G. A. Calin, C. G. Liu, C. M. Croce, y C. C. Harris, Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell, 2006. 9(3): p. 189-98.
16. Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, y M. Stoffel, Silencing ofmicroRNAs in vivo with 'antagomirs'. Nature, 2005. 438(7068): p. 685-9.
17. Lid, C. G., G. A. Calin, B. Meloon, N. Gamliel, C. Sevignani, M. Ferracin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, S. Zupo, M. Dono, H. Alder, F. Bullrich, M. Negrini, y C. M. Croce, An oligonucleotide microchip, for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(26): p. 9740-4.
18. Iorio, M. V., M. Ferracin, C. G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J. P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G.A. Calin, P. Querzoll, M. Negrini, y C. M. Croce, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res, 2005. 65 (16): p. 7065-70.
19. Cheng, A. M., M. W. Byrom, J. Shelton, y L. P. Ford, Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. Nucleic Acids Res, 2005. 33(4): p. 1290-7.
20. Tanzer, A. and P. F. Stadler, Molecular evolution of a microRNA cluster. J Mol Biol, 2004. 339(2): p. 327-35.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar si un sujeto tiene un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia, que comprende:

medir el nivel de al menos un producto génico miR-203 en una muestra de ensayo que comprende una célula de adenocarcinoma de colon del sujeto en donde dicho sujeto tiene adenocarcinoma de colon,
en el que un aumento en al menos el nivel del producto génico miR-203 en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, indica si el sujeto tiene un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia.

2. Un método para evaluar un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia que comprende:

(1) determinar un nivel de expresión de al menos un marcador en una muestra que comprende una célula de adenocarcinoma de colon de un sujeto de ensayo que tiene adenocarcinoma de colon; incluyendo el al menos un marcador al menos un producto génico miR-203;
(2) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa (1) con un nivel de expresión control del marcador en una muestra de un sujeto sano; y
(3) evaluar si el sujeto tiene un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia cuando el resultado de la comparación de la etapa (2) indica que:

el nivel de expresión de al menos un marcador, en el sujeto de ensayo, es mayor que en el control.

3. El método de ensayo de la reivindicación 2, en el que la muestra comprende uno o más de tejido, sangre, plasma, suero, orina y heces.

4. El método de ensayo de la reivindicación 2, en el que todas las etapas del método se realizan *in vitro*.

5. Un método para diagnosticar si un sujeto tiene adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia, que comprende:

(1) efectuar la transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, en donde dicho sujeto tiene adenocarcinoma de colon;
(2) hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN-203 para proporcionar un perfil de hibridación de la muestra de ensayo; y
(3) comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control,

en donde un aumento en la señal del miR-203 indica si el sujeto tiene adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia.

6. El método de la reivindicación 1, en el que se evalúa un nivel de expresión del producto génico miR-203 detectando la presencia de un polinucleótido transcrito, o parte del mismo, en donde el polinucleótido transcrito comprende una región codificante del producto génico miR-203.

7. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra es un fluido o un tejido corporal asociado con cáncer de colon.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra comprende células obtenidas del paciente.

9. El método de la reivindicación 1, en el que el al menos un producto génico miR-203 incluye variantes aislada o fragmentos biológicamente activos de las mismas.

10. Un método de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende medir el nivel de al menos un producto génico miR adicional en la muestra de ensayo, en el que el miR se selecciona del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR- 106a; miR-103-2; miR-29a; y miR-10a.

11. Un método de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende medir el nivel de al menos dos o más productos génicos miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-29a; and miR-10a.

12. Un método de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende medir el nivel de al menos tres o más productos génicos miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-29a; y miR-10a.

13. Un método de la reivindicación 2, que adicionalmente comprende medir el nivel de al menos un producto génico miR adicional en la muestra de ensayo, en el que el miR se selecciona del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR- 106a; miR-103-2; miR-29a; y miR-10a.

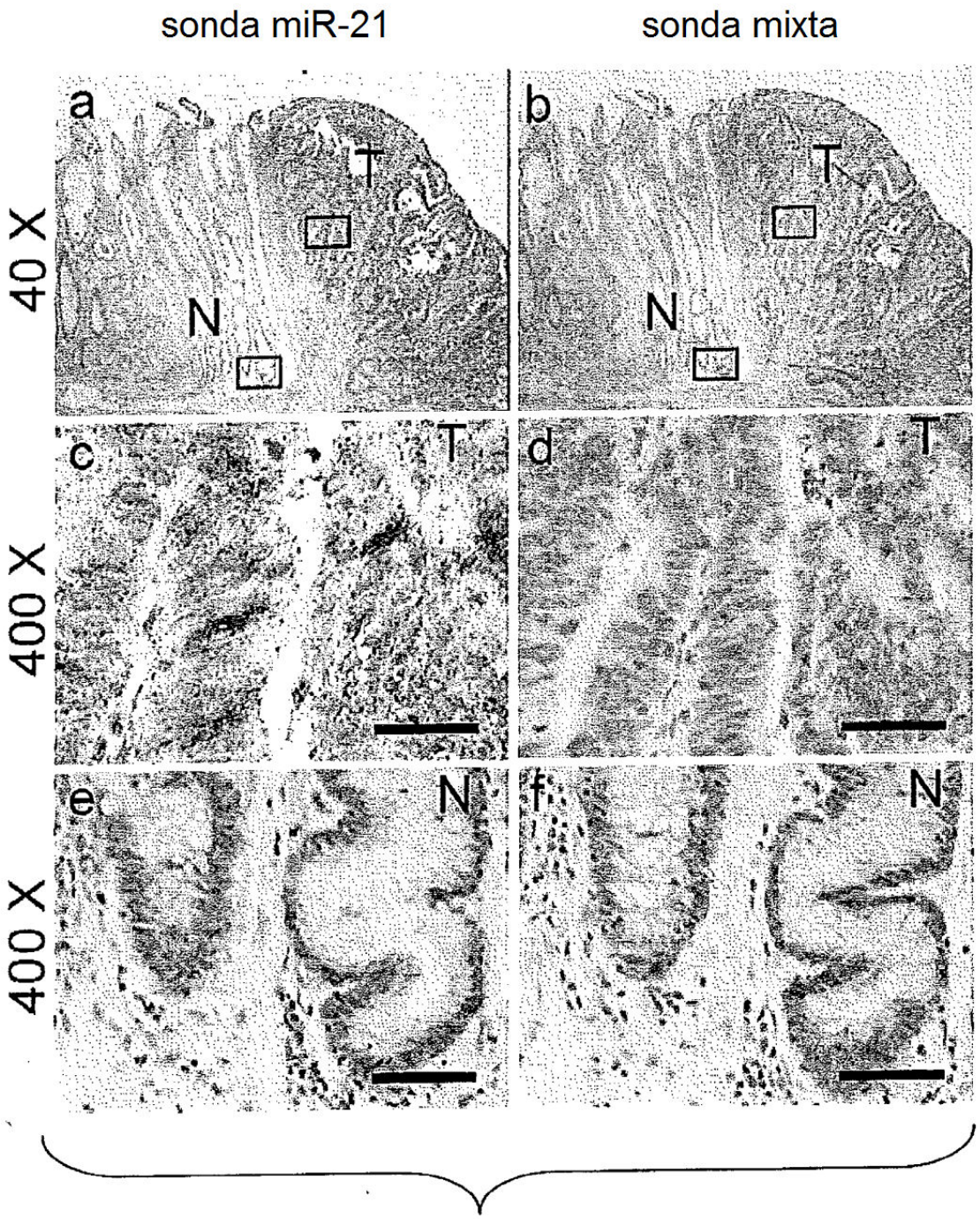
14. Un método de la reivindicación 2, que adicionalmente comprende medir el nivel de al menos dos o más productos génicos miR en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-29a; y miR-10a.

15. Un método de la reivindicación 2, que adicionalmente comprende medir el nivel de al menos tres o más productos génicos miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-29a; y miR-10a.

16. Un método de la reivindicación 5, que adicionalmente comprende medir el nivel de al menos un producto génico miR adicional en la muestra de ensayo, en el que el miR se selecciona del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR- 106a; miR-103-2; miR-29a; y miR-10a.

17. Un método de la reivindicación 5, que adicionalmente comprende medir el nivel de al menos dos o más productos génicos miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-29a; y miR-10a.

18. Un método de la reivindicación 5, que adicionalmente comprende medir el nivel de al menos tres o más productos génicos miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR se seleccionan del grupo que consiste en: miR-21; miR-181b; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-29a; y miR-10a.



Figuras 1a - 1f

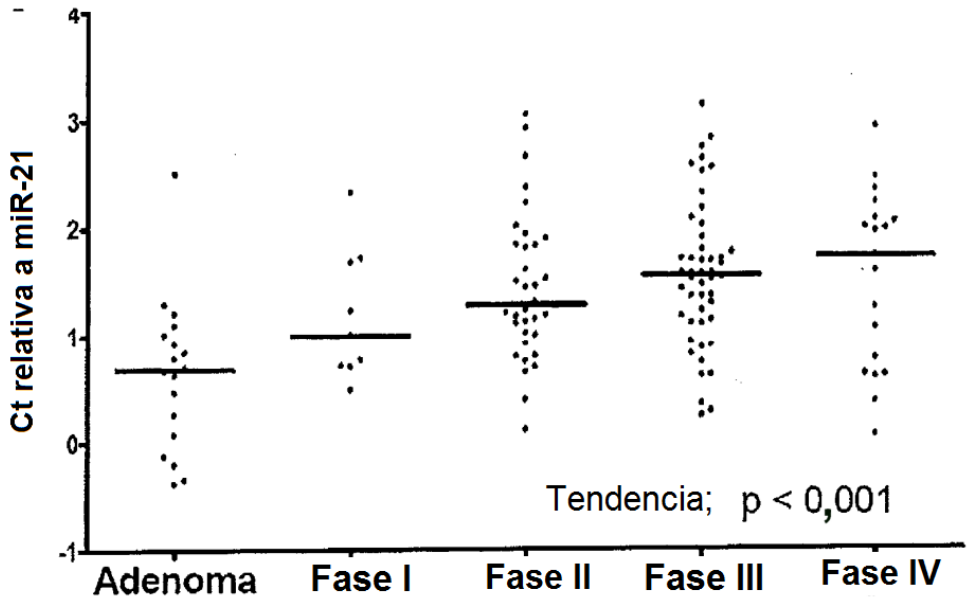


Figura 1g

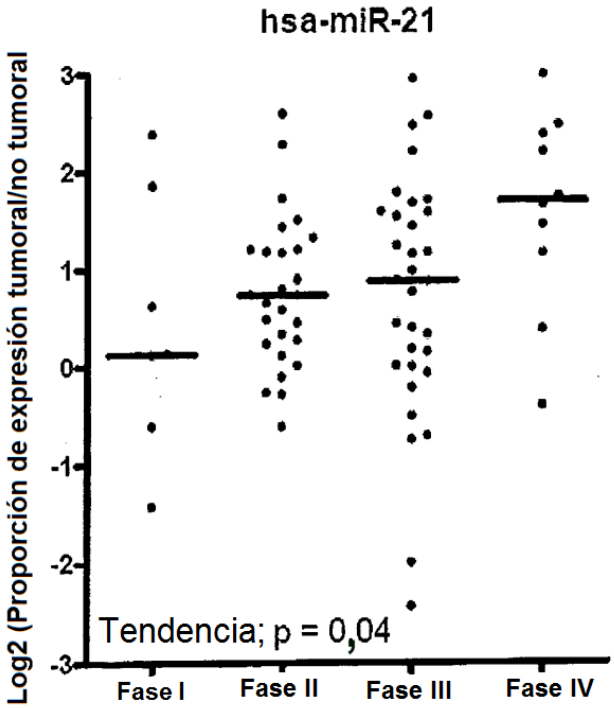


Figura 2

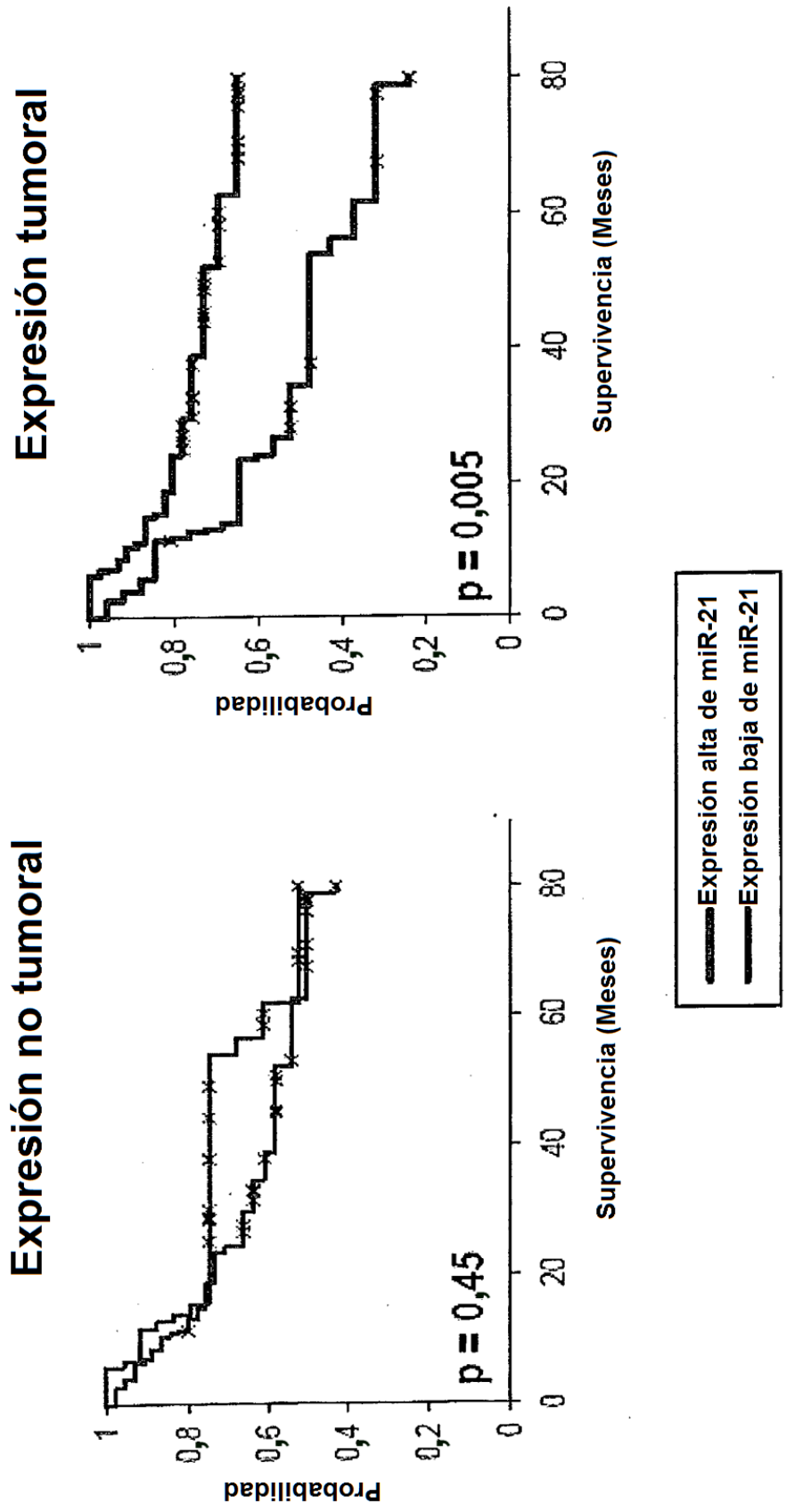

Expresión tumoral
Probabilidad
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p = 0,005
0
20
40
60
80
Supervivencia (Meses)
Expresión no tumoral
Probabilidad
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p = 0,45
0
20
40
60
80
Supervivencia (Meses)
Expresión alta de miR-21
Expresión baja de miR-21

Figura 3a

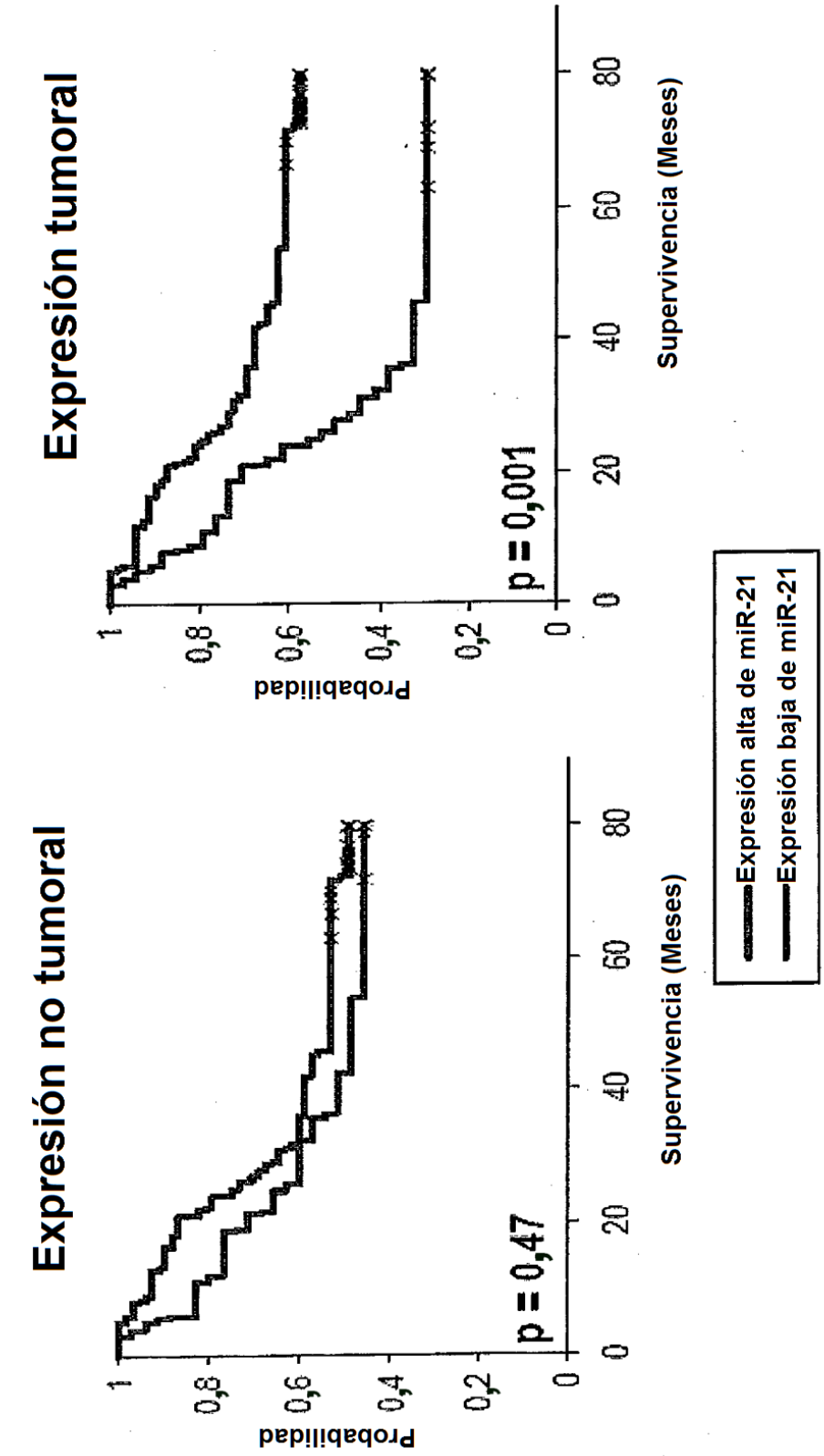

Expresión tumoral
Probabilidad
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p = 0,001
0
20
40
60
80
Supervivencia (Meses)
Expresión no tumoral
Probabilidad
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p = 0,47
0
20
40
60
80
Supervivencia (Meses)
Expresión alta de miR-21
Expresión baja de miR-21

Figura 3b

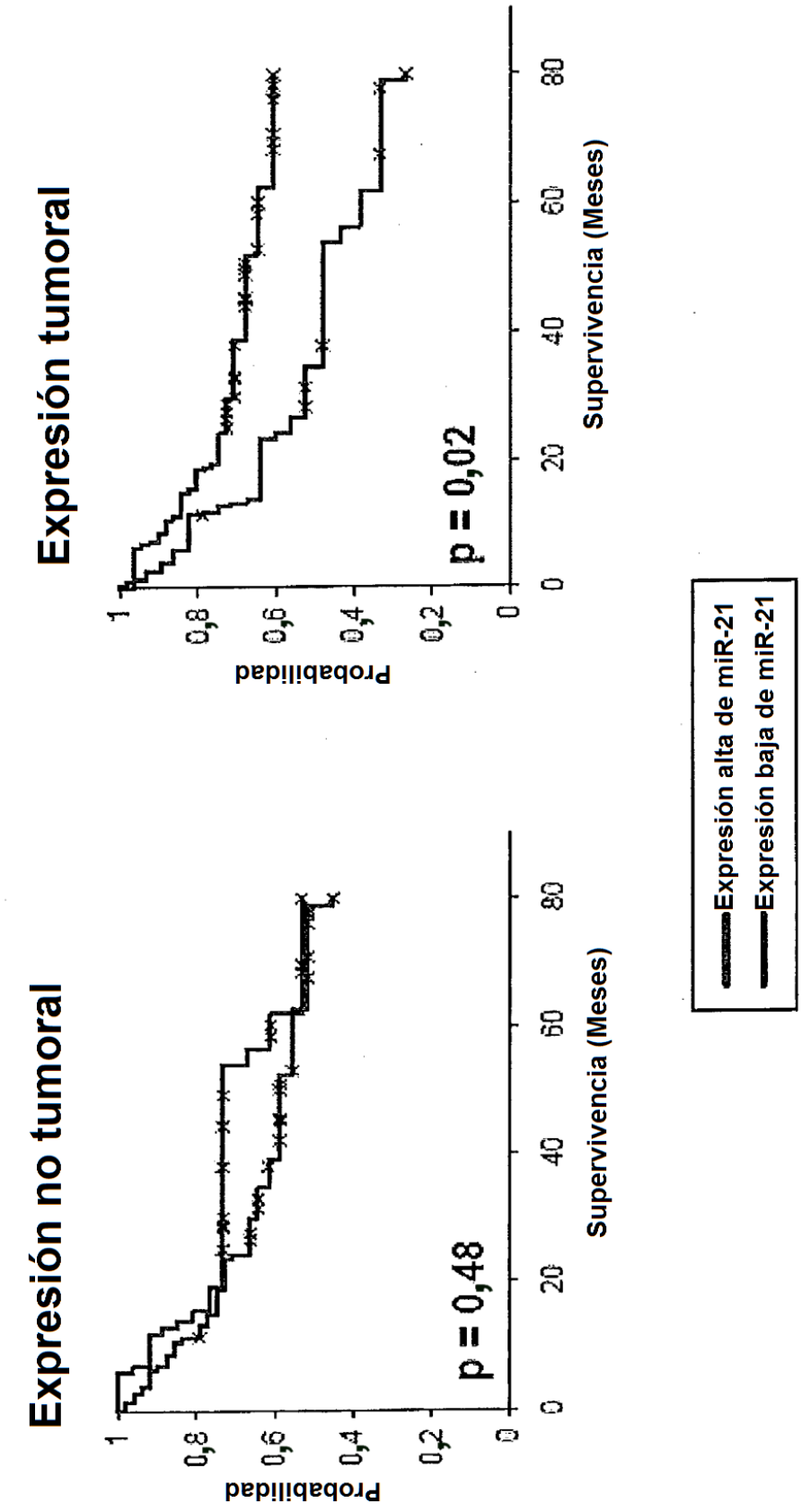

Expresión tumoral
Probabilidad
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p = 0,02
0
20
40
60
80
Supervivencia (Meses)
Expresión no tumoral
Probabilidad
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p = 0,48
0
20
40
60
80
Supervivencia (Meses)
Expresión alta de miR-21
Expresión baja de miR-21

Figura 4a

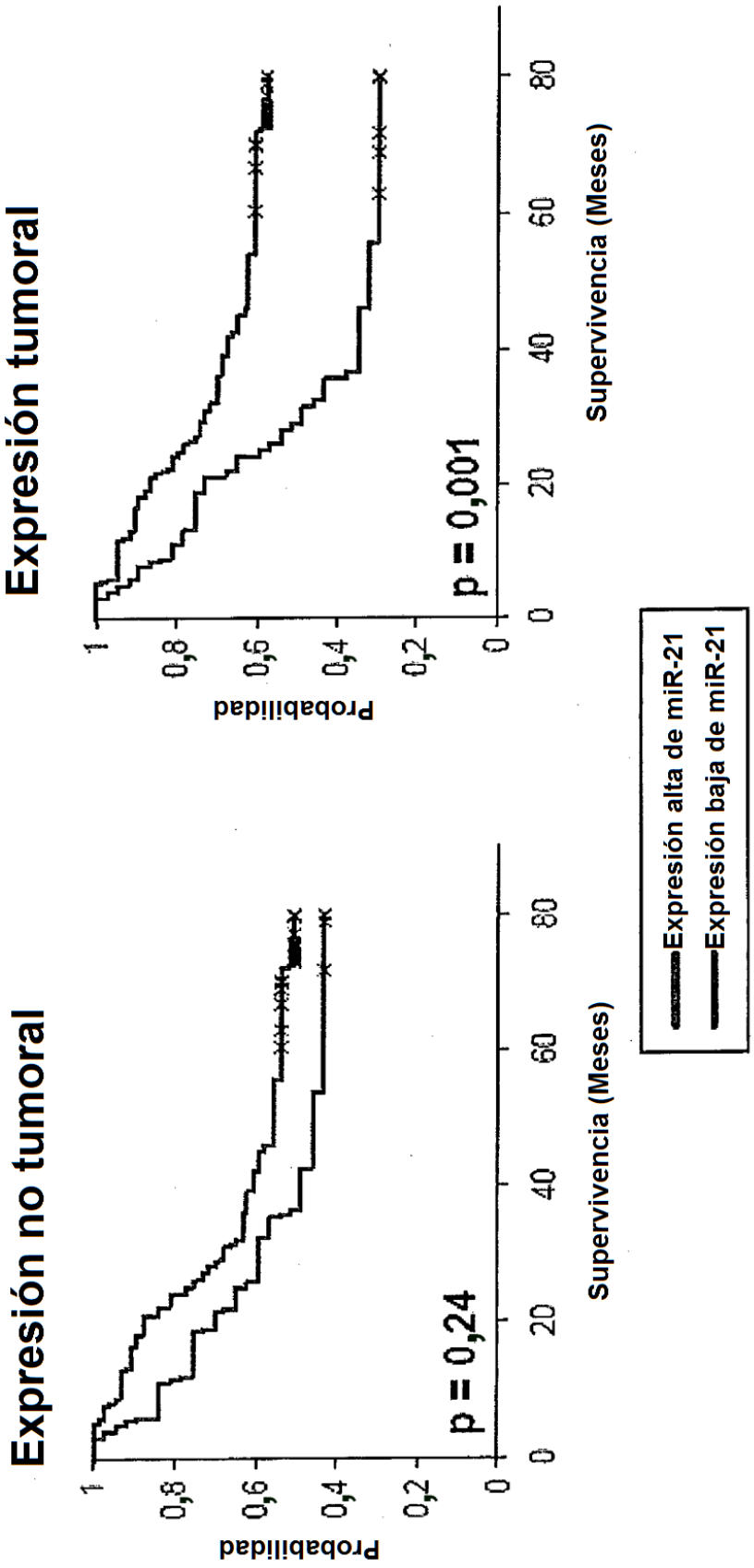

Expresión tumoral
Probabilidad
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p = 0,001
0
20
40
60
80
Supervivencia (Meses)
Expresión no tumoral
Probabilidad
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p = 0,24
0
20
40
60
80
Supervivencia (Meses)
Expresión alta de miR-21
Expresión baja de miR-21

Figura 4b

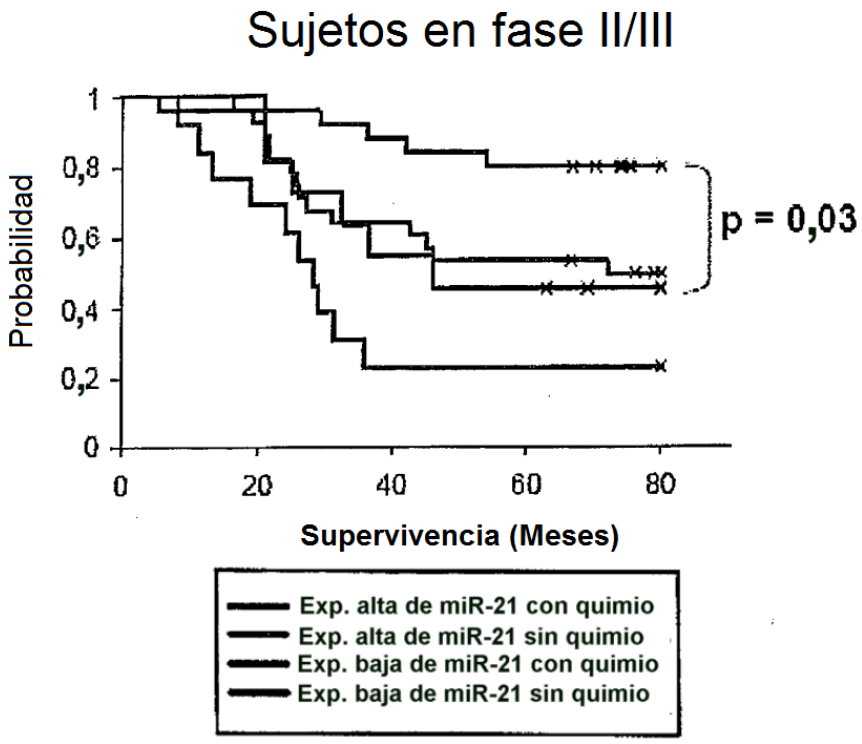


Figura 5a

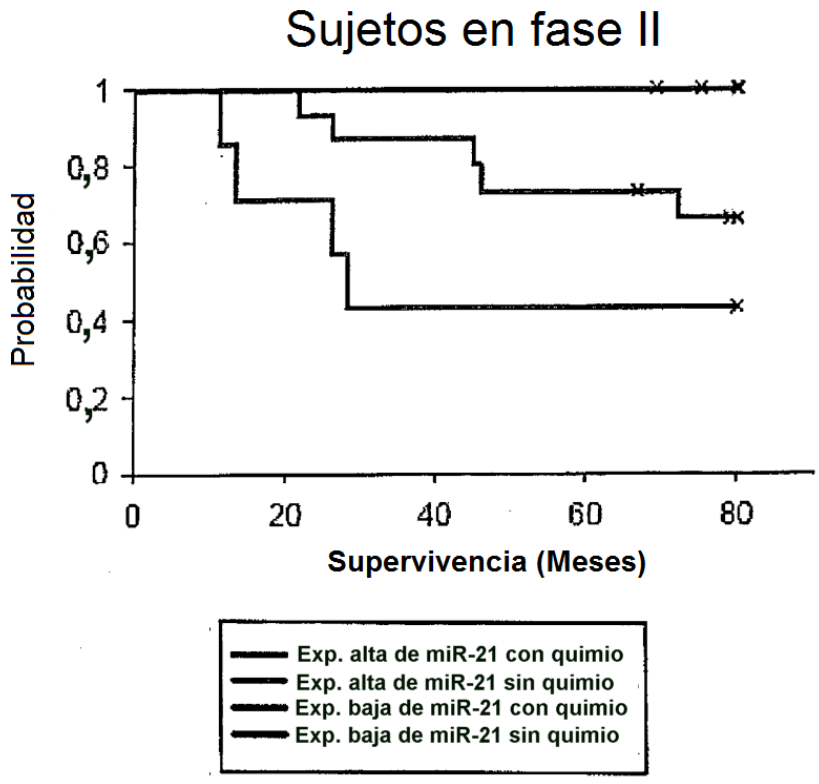


Figura 5b

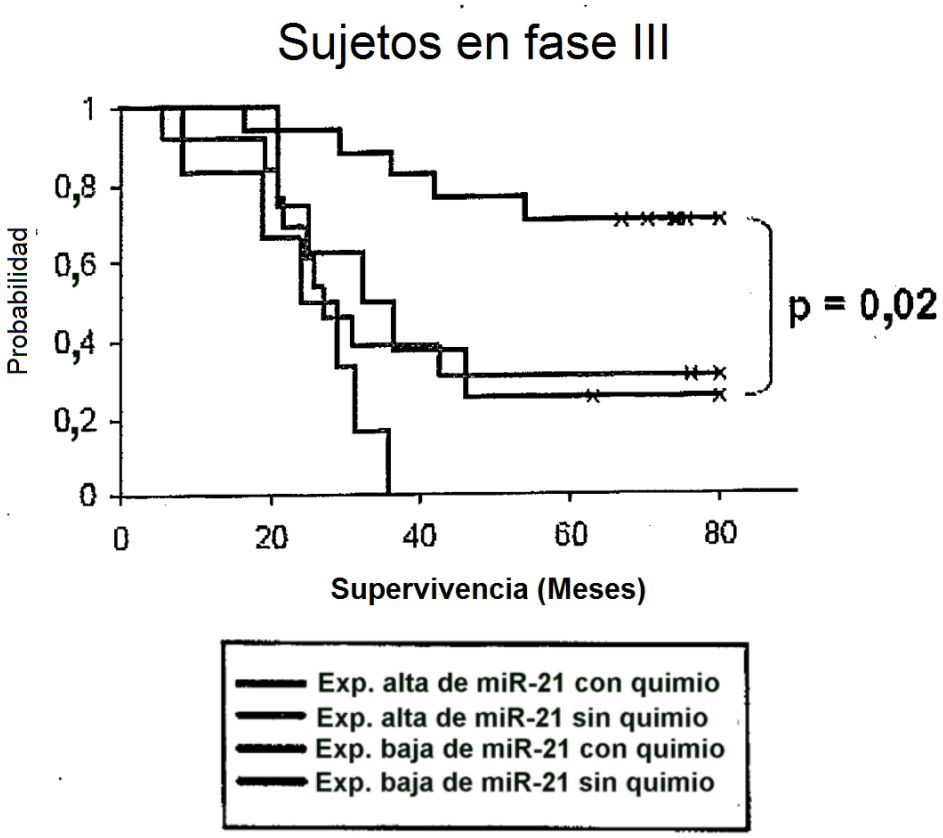

Sujetos en fase III
Probabilidad
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
20
40
60
80
Supervivencia (Meses)
p = 0,02
Exp. alta de miR-21 con quimio
Exp. alta de miR-21 sin quimio
Exp. baja de miR-21 con quimio
Exp. baja de miR-21 sin quimio

Figura 5c

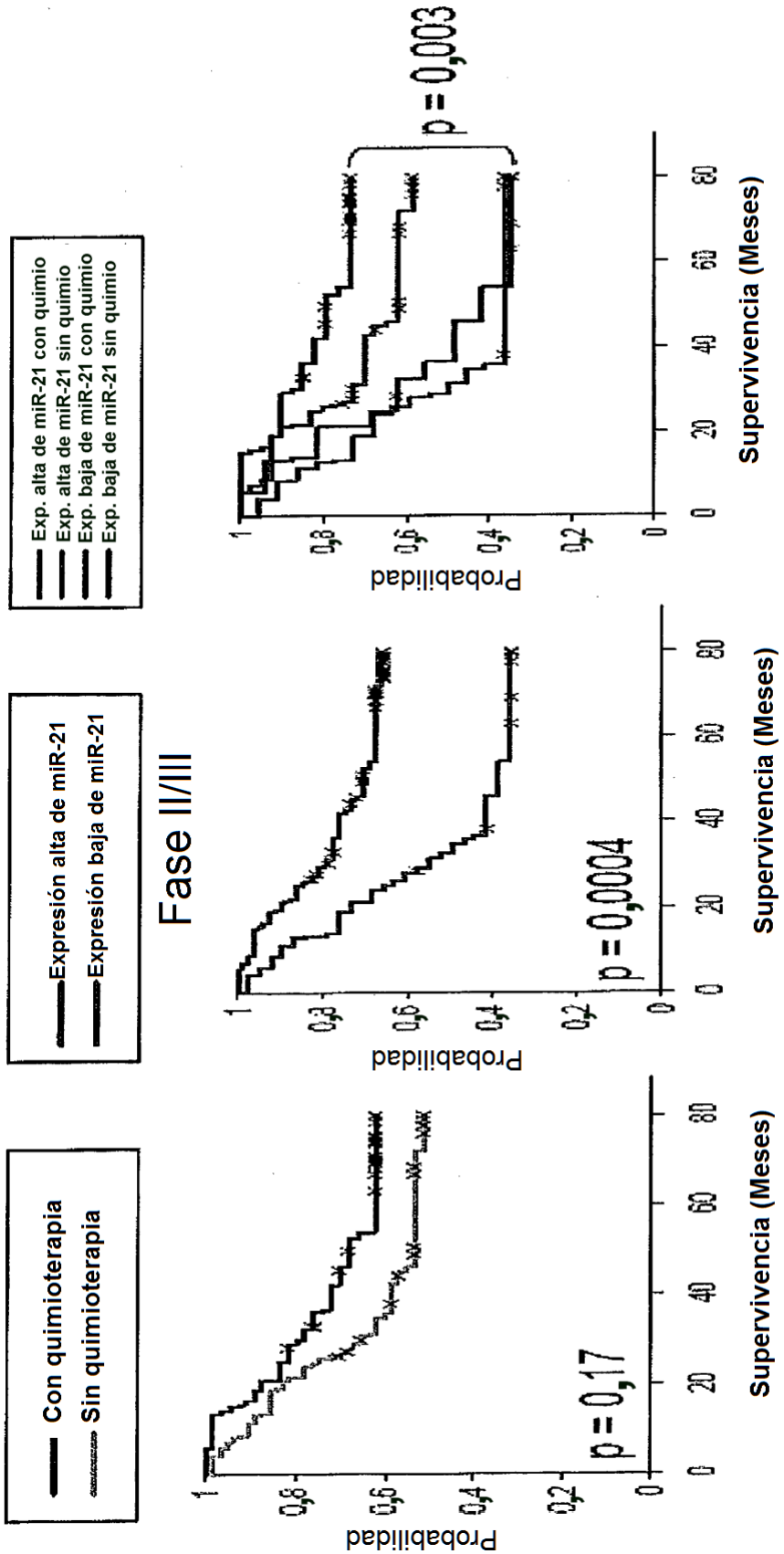

Con quimioterapia
Sin quimioterapia
Expresión alta de miR-21
Expresión baja de miR-21
Exp. alta de miR-21 con quimio
Exp. alta de miR-21 sin quimio
Exp. baja de miR-21 con quimio
Exp. baja de miR-21 sin quimio
Fase II/III
Probabilidad
Supervivencia (Meses)
p = 0,17
p = 0,0004
p = 0,003

Figura 6a

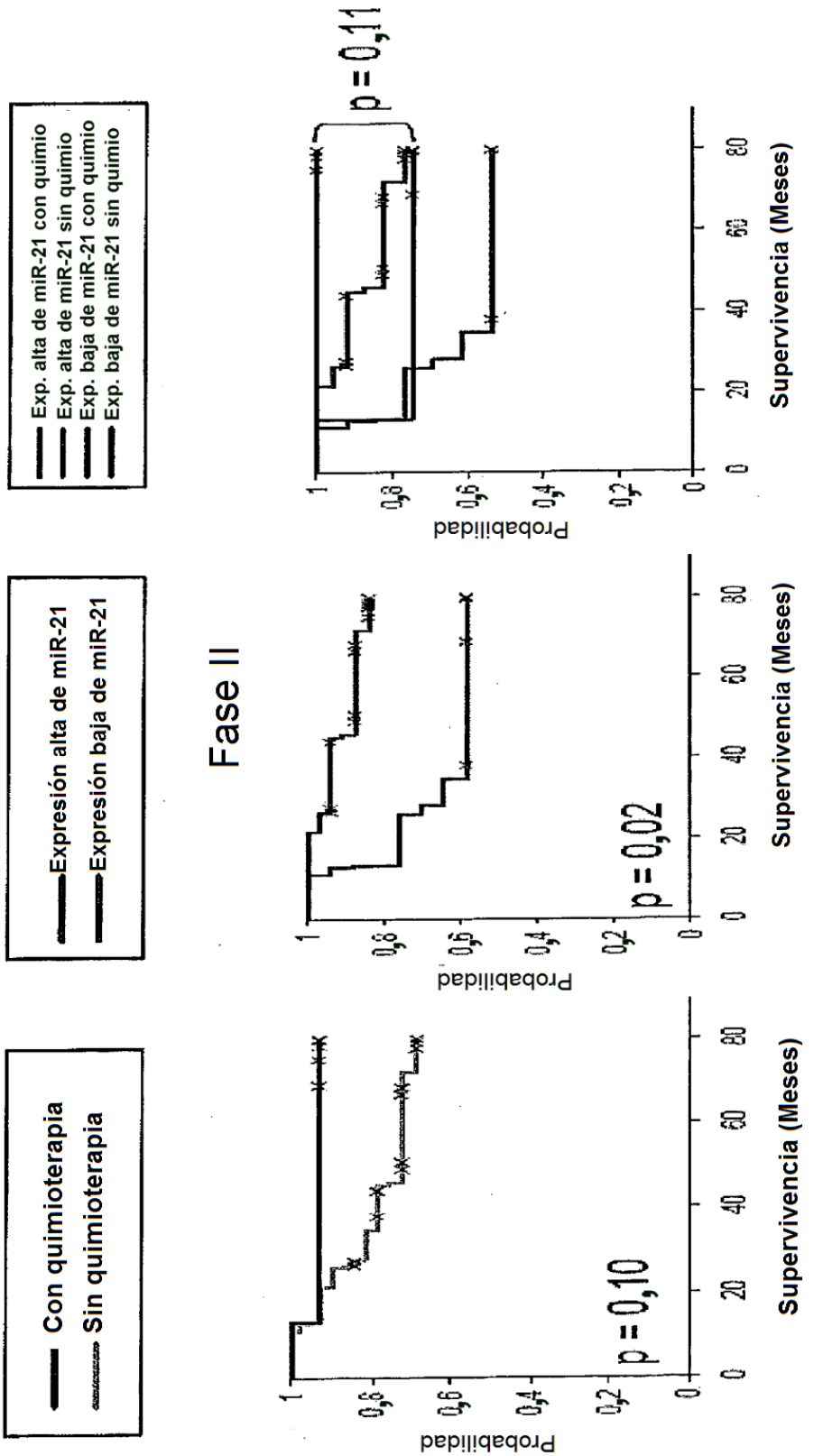

Con quimioterapia
Sin quimioterapia
Expresión alta de miR-21
Expresión baja de miR-21
Exp. alta de miR-21 con quimio
Exp. alta de miR-21 sin quimio
Exp. baja de miR-21 con quimio
Exp. baja de miR-21 sin quimio
Fase II
p = 0,10
p = 0,02
p = 0,11
Probabilidad
Supervivencia (Meses)

Figura 6b

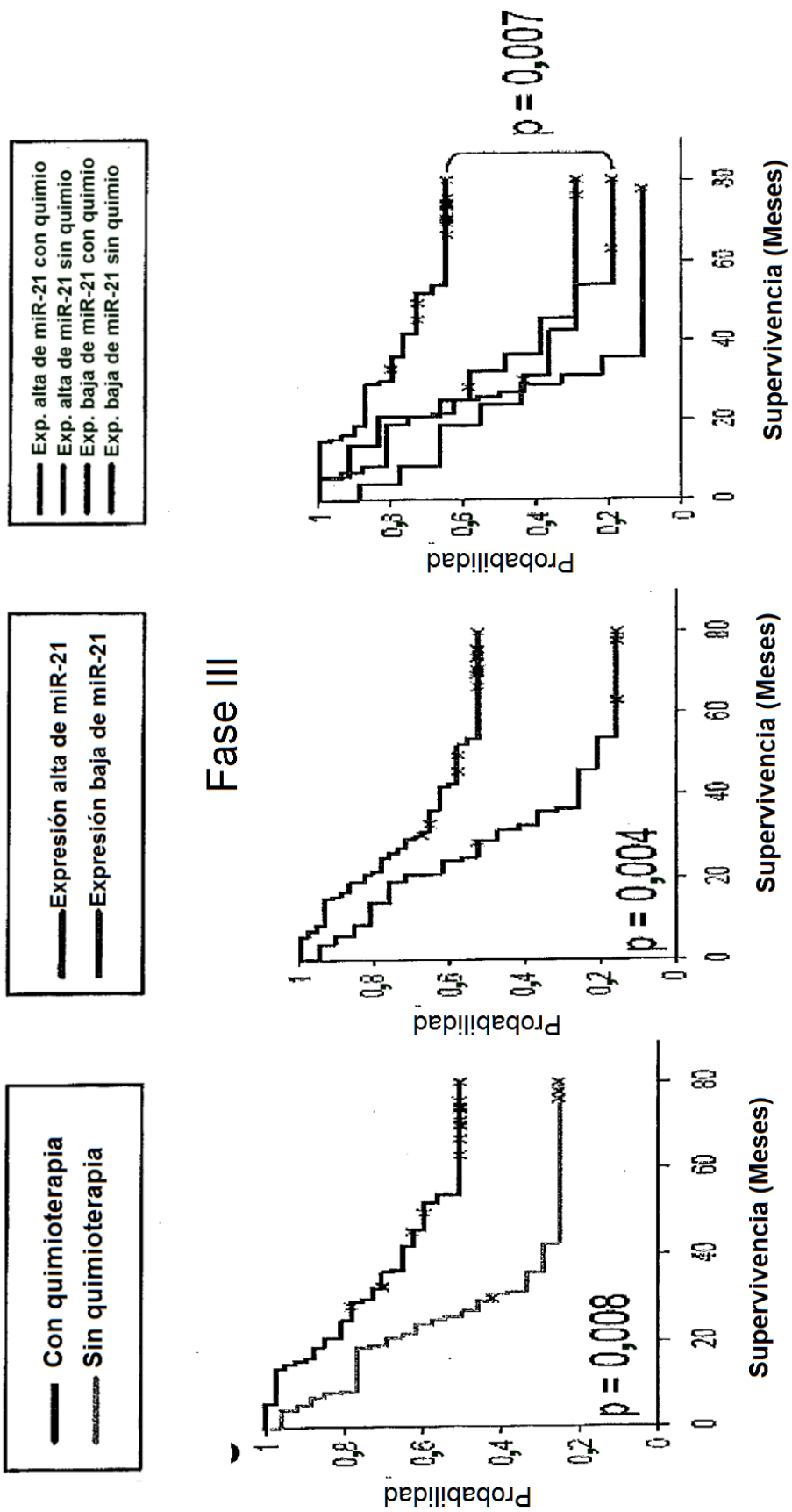

Con quimioterapia
Sin quimioterapia
Expresión alta de miR-21
Expresión baja de miR-21
Exp. alta de miR-21 con quimio
Exp. alta de miR-21 sin quimio
Exp. baja de miR-21 con quimio
Exp. baja de miR-21 sin quimio
Fase III
Probabilidad
Supervivencia (Meses)
p = 0,008
p = 0,004
p = 0,007

Figura 6c

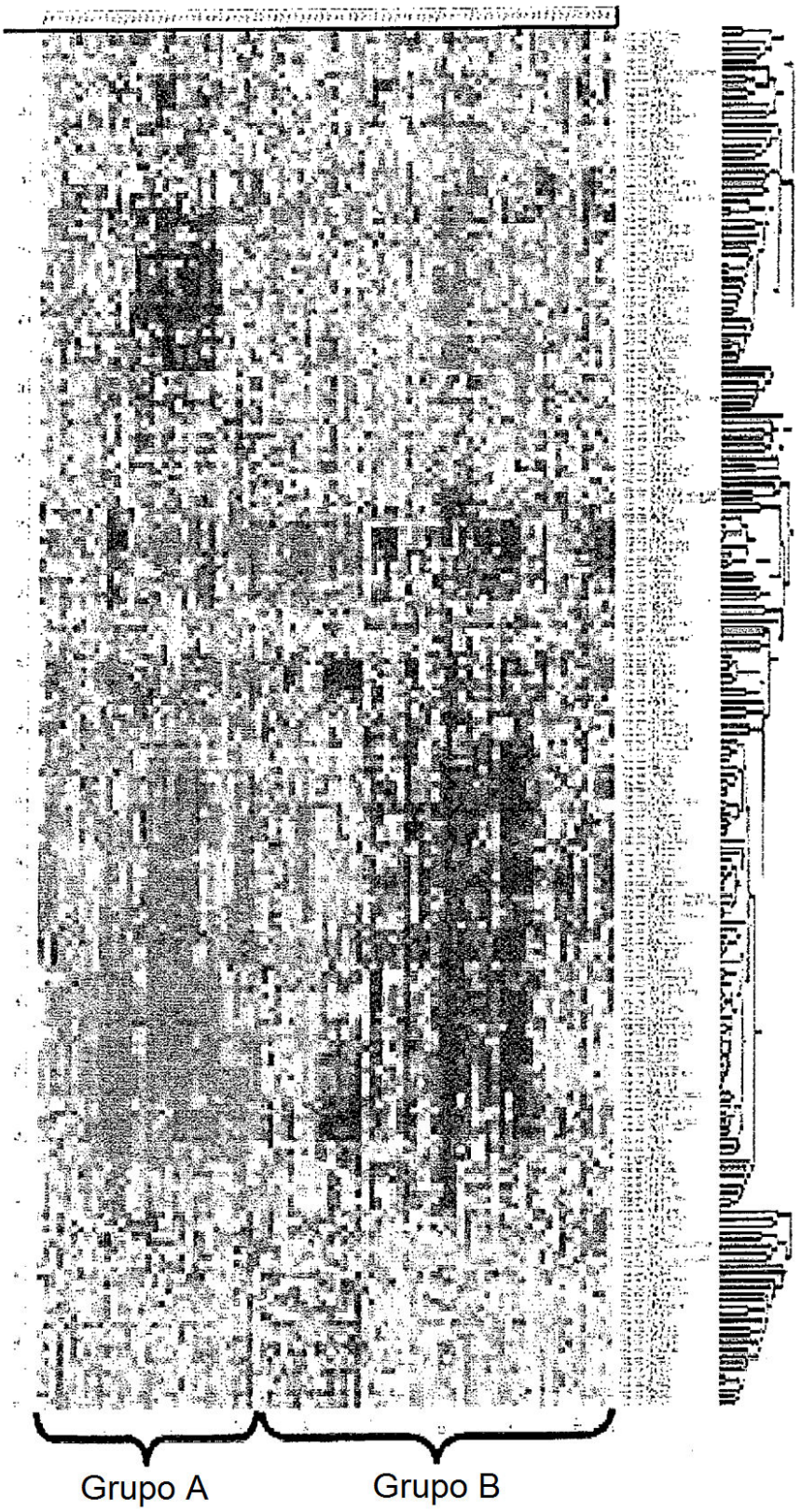


Figura 7a

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

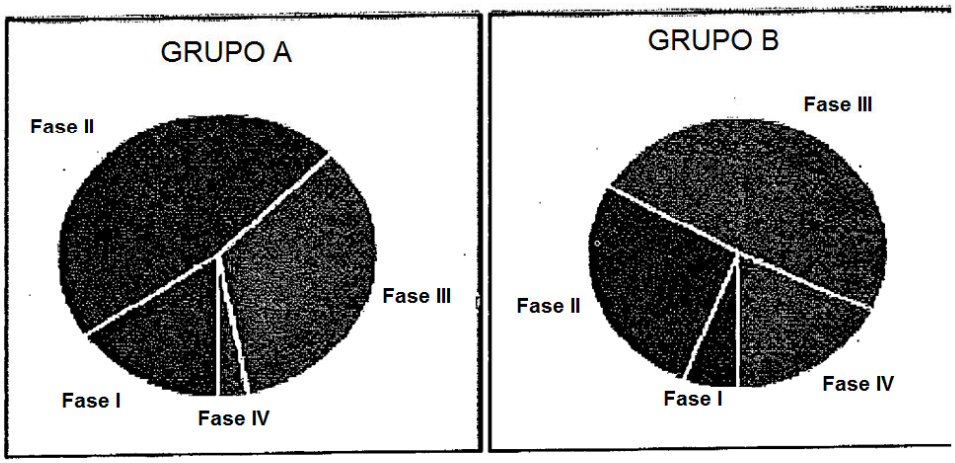


Figura 7b

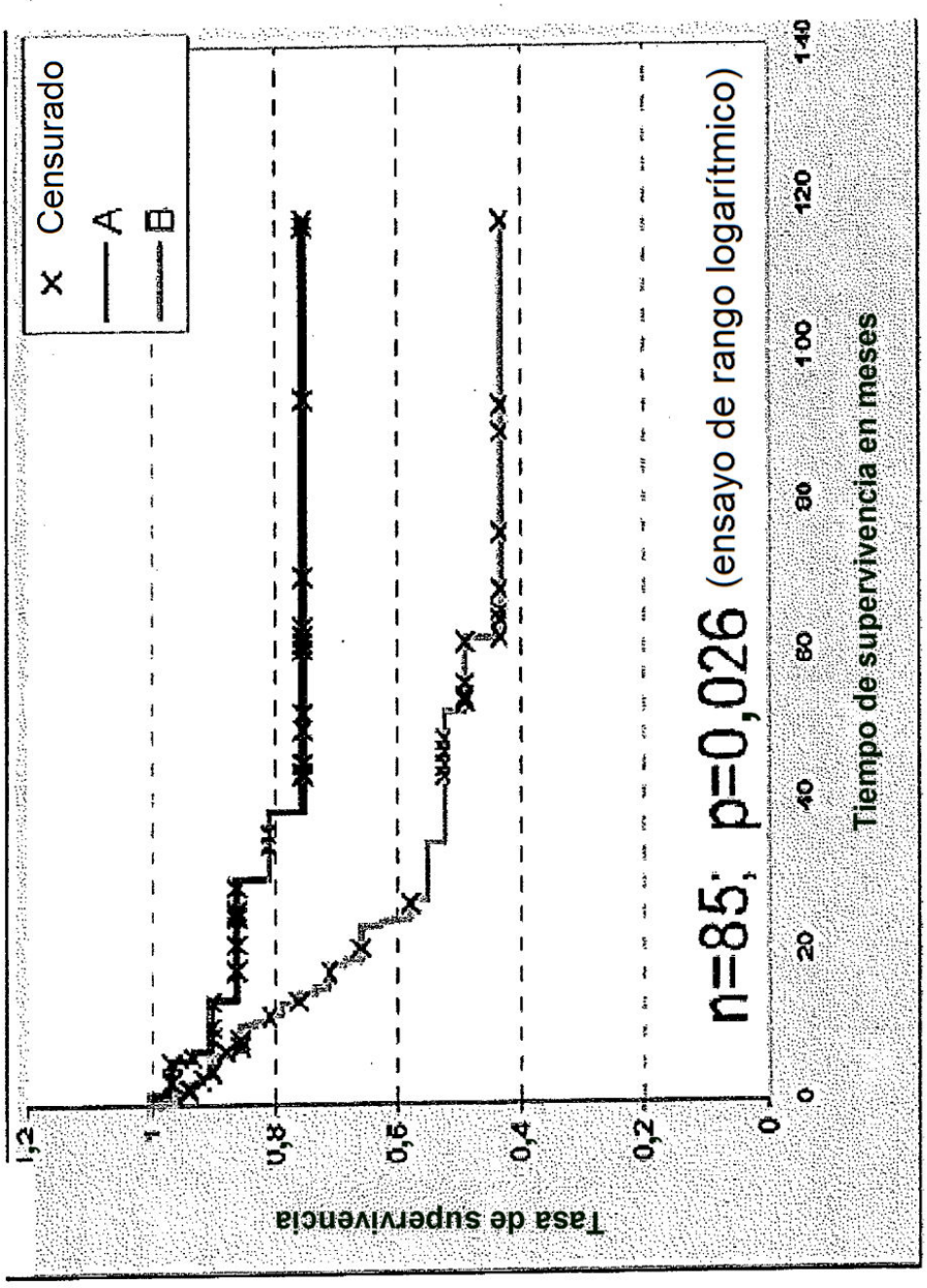

Censurado
A
B
n=85; p=0,026 (ensayo de rango logarítmico)
Tasa de supervivencia
Tiempo de supervivencia en meses
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
20
40
60
80
100
120
140

Figura 7c

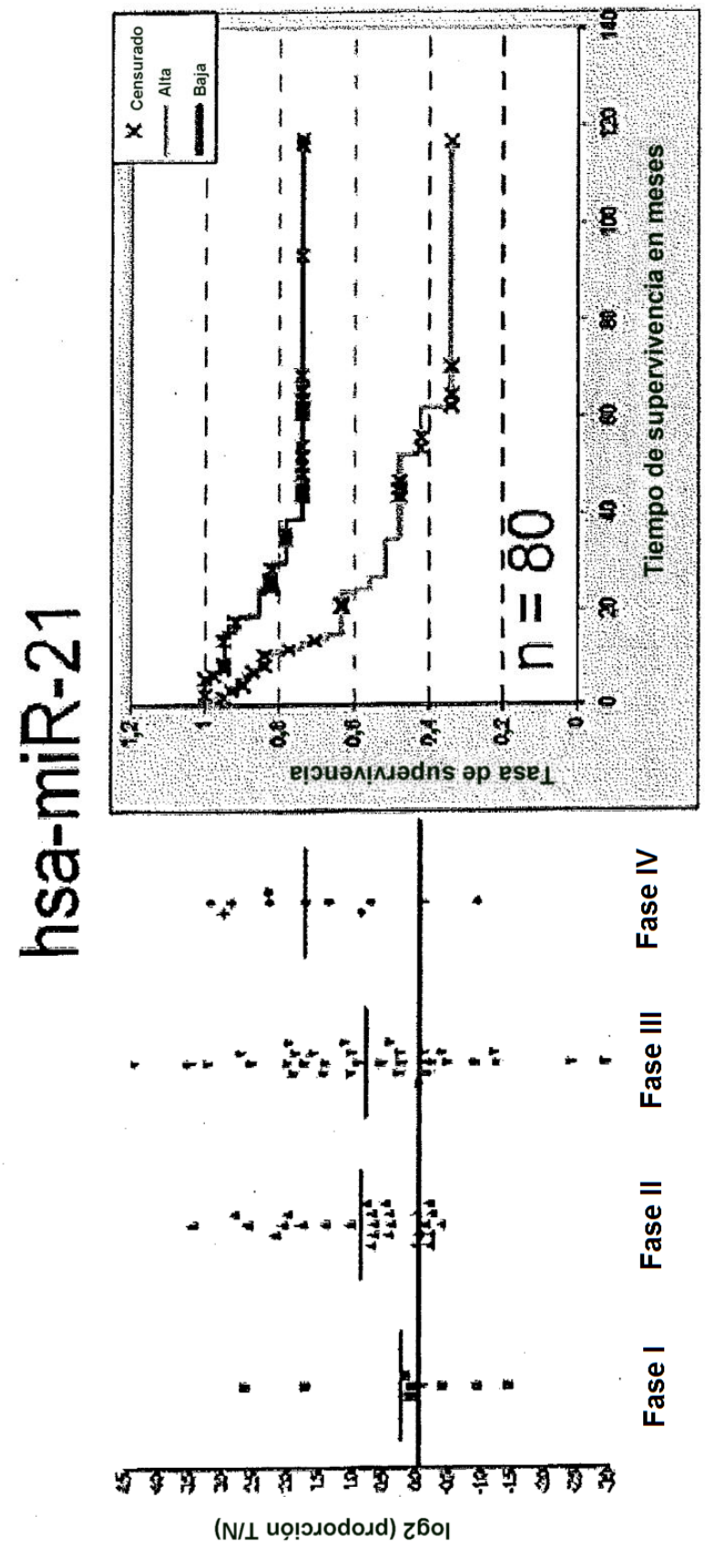

hsa-miR-21
log2 (proporción T/N)
Fase I
Fase II
Fase III
Fase IV
Tendencia; p = 0,034
Tasa de supervivencia
Tiempo de supervivencia en meses
n = 80
Censurado
Alta
Baja
p = 0,004 (rango logarítmico)
alto basado en la mediana

Figura 8a

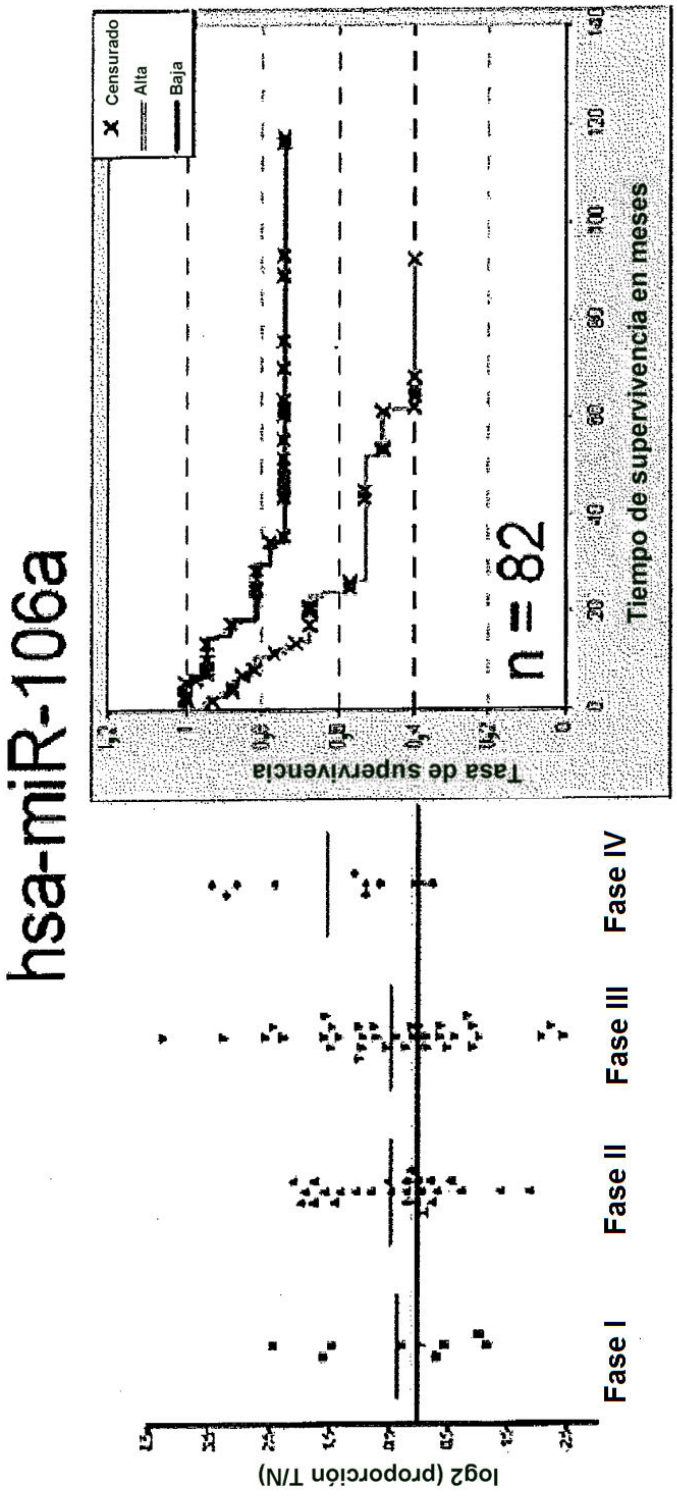

hsa-miR-106a
Censurado
Alta
Baja
Tasa de supervivencia
n = 82
Tiempo de supervivencia en meses
log2 (proporción T/N)
Fase I
Fase II
Fase III
Fase IV
Tendencia; p = 0,13
p = 0,013 (rango logarítmico)
alto basado en la mediana

Figura 8b

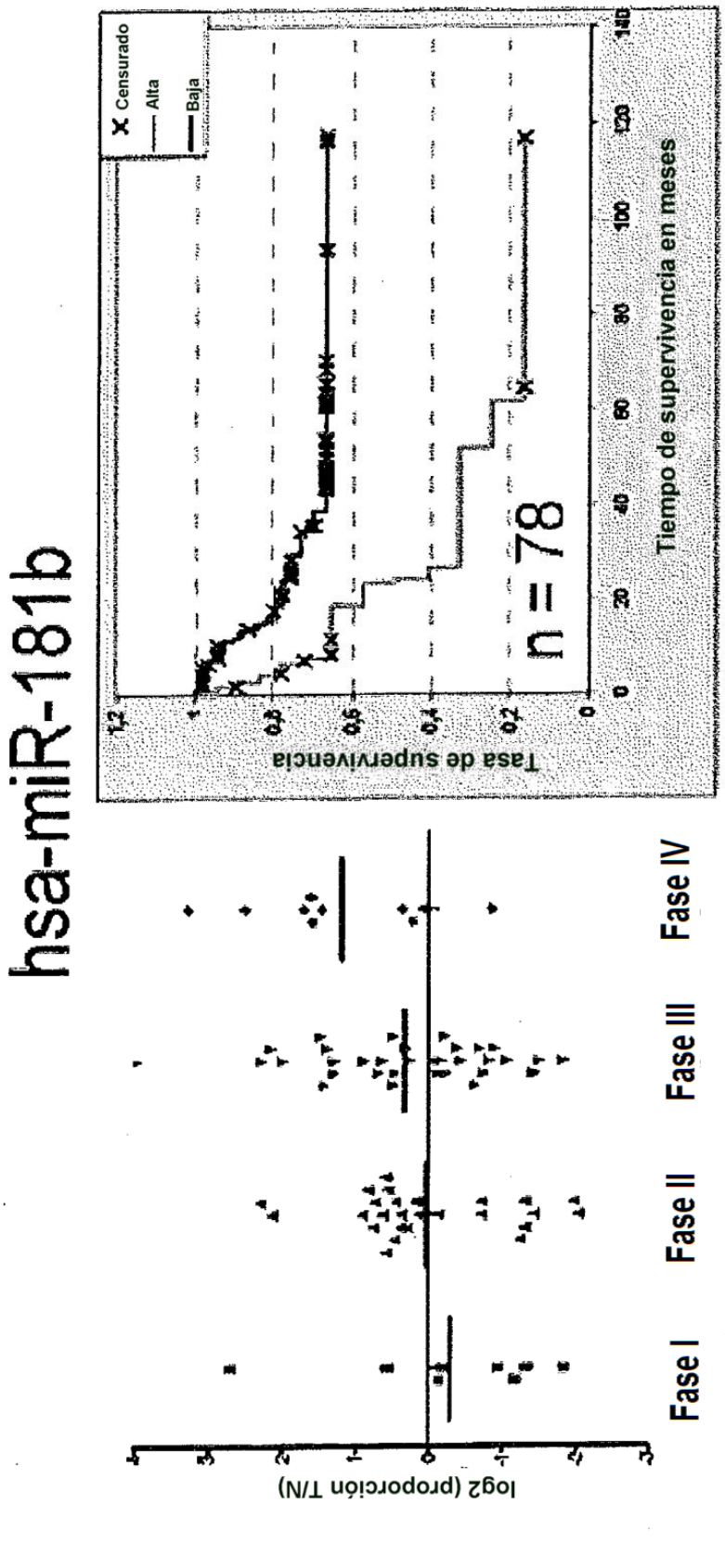

hsa-miR-181b
Censurado
Alta
Baja
Tasa de supervivencia
Tiempo de supervivencia en meses
n = 78
log2 (proporción T/N)
Fase I
Fase II
Fase III
Fase IV
Tendencia; p = 0,016
p = 0,0003 (rango logarítmico)
alto basado en el cuartil más alto

Figura 8c

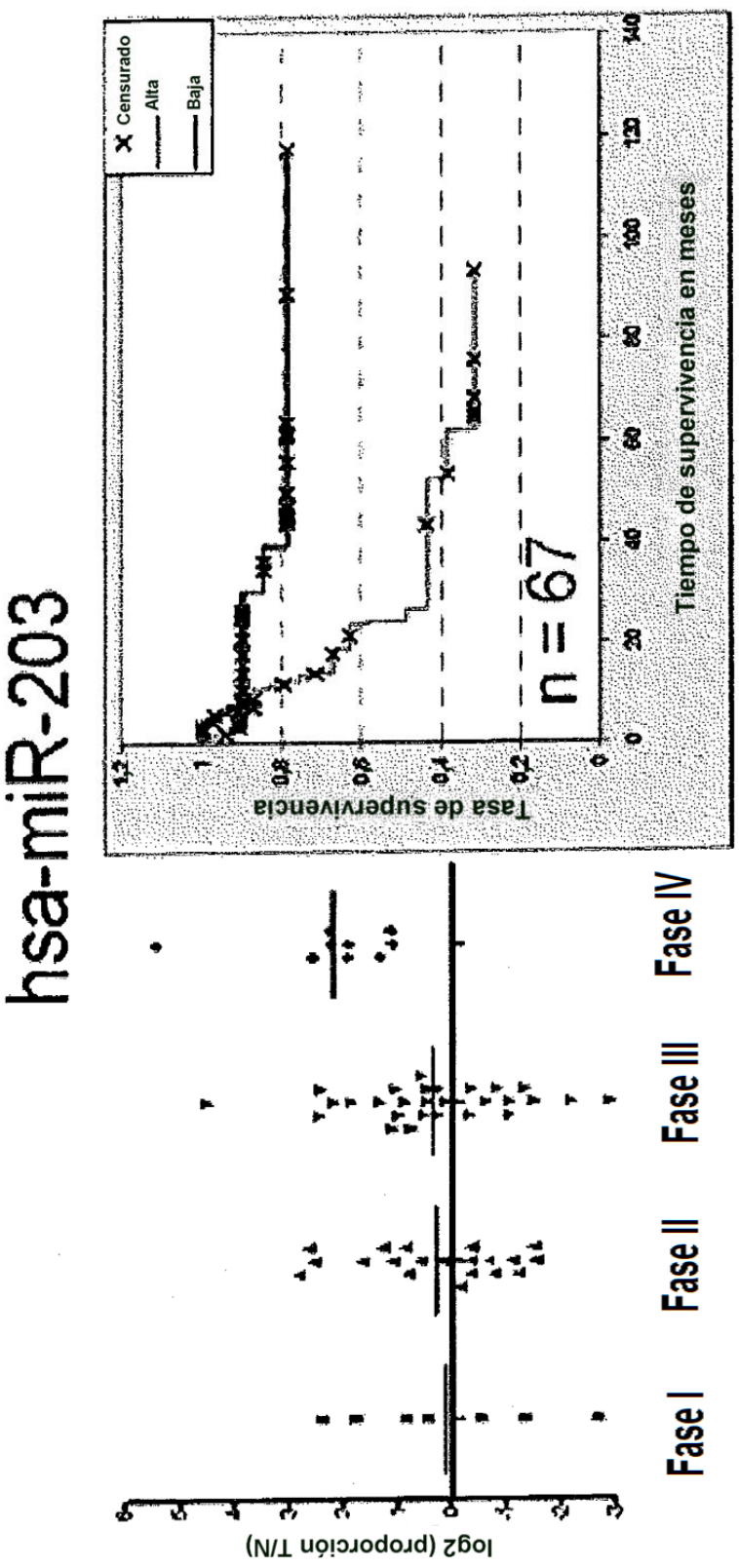

hsa-miR-203
Censurado
Alta
Baja
Tasa de supervivencia
Tiempo de supervivencia en meses
n = 67
log2 (proporción T/N)
Fase I
Fase II
Fase III
Fase IV
Tendencia; p = 0,016
p = 0,004 (rango logarítmico)
alto basado en la mediana

Figura 8d

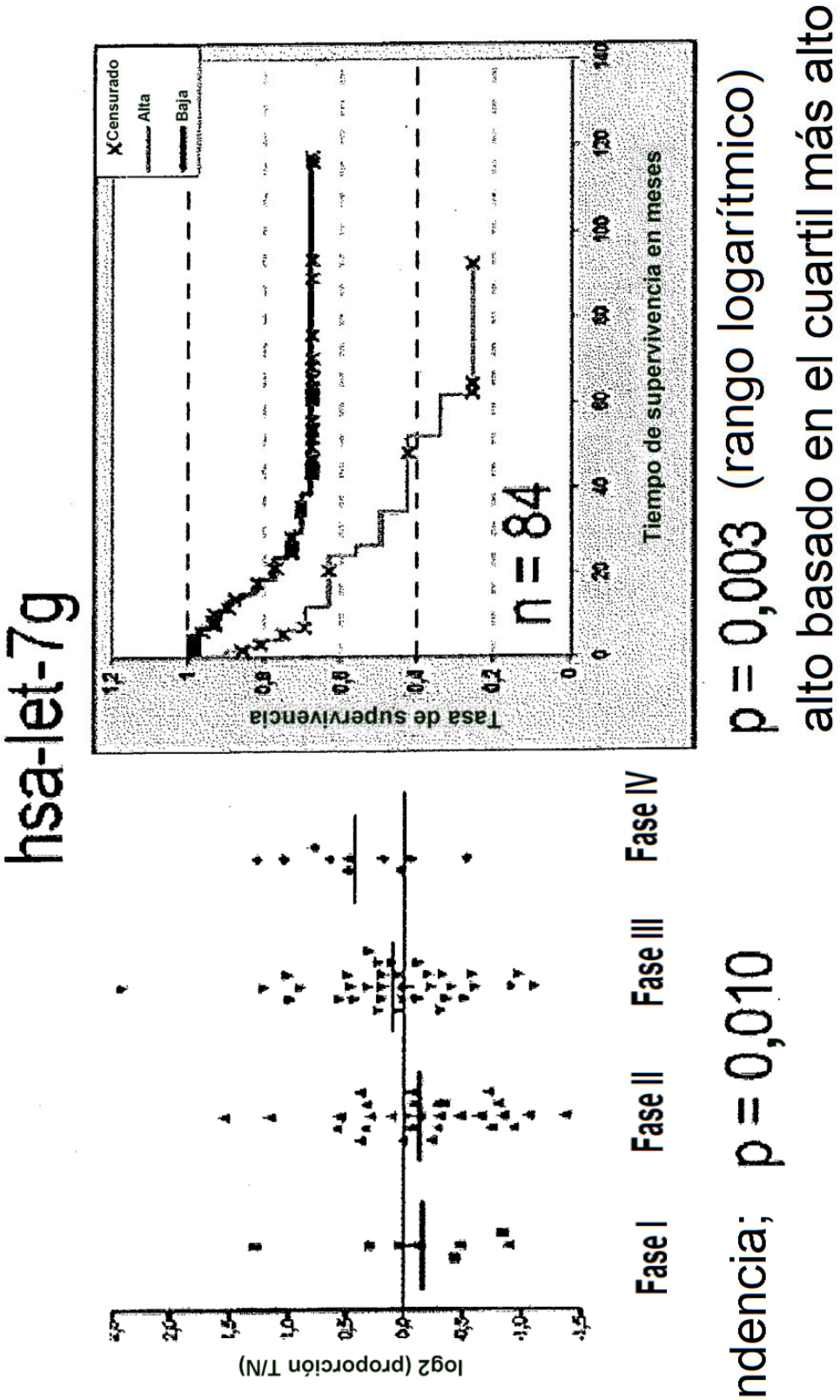

hsa-let-7g
Censurado
Alta
Baja
Tasa de supervivencia
Tiempo de supervivencia en meses
n = 84
log2 (proporción T/N)
Fase I
Fase II
Fase III
Fase IV
Tendencia; p = 0,010
p = 0,003 (rango logarítmico)
alto basado en el cuartil más alto

Figura 8e

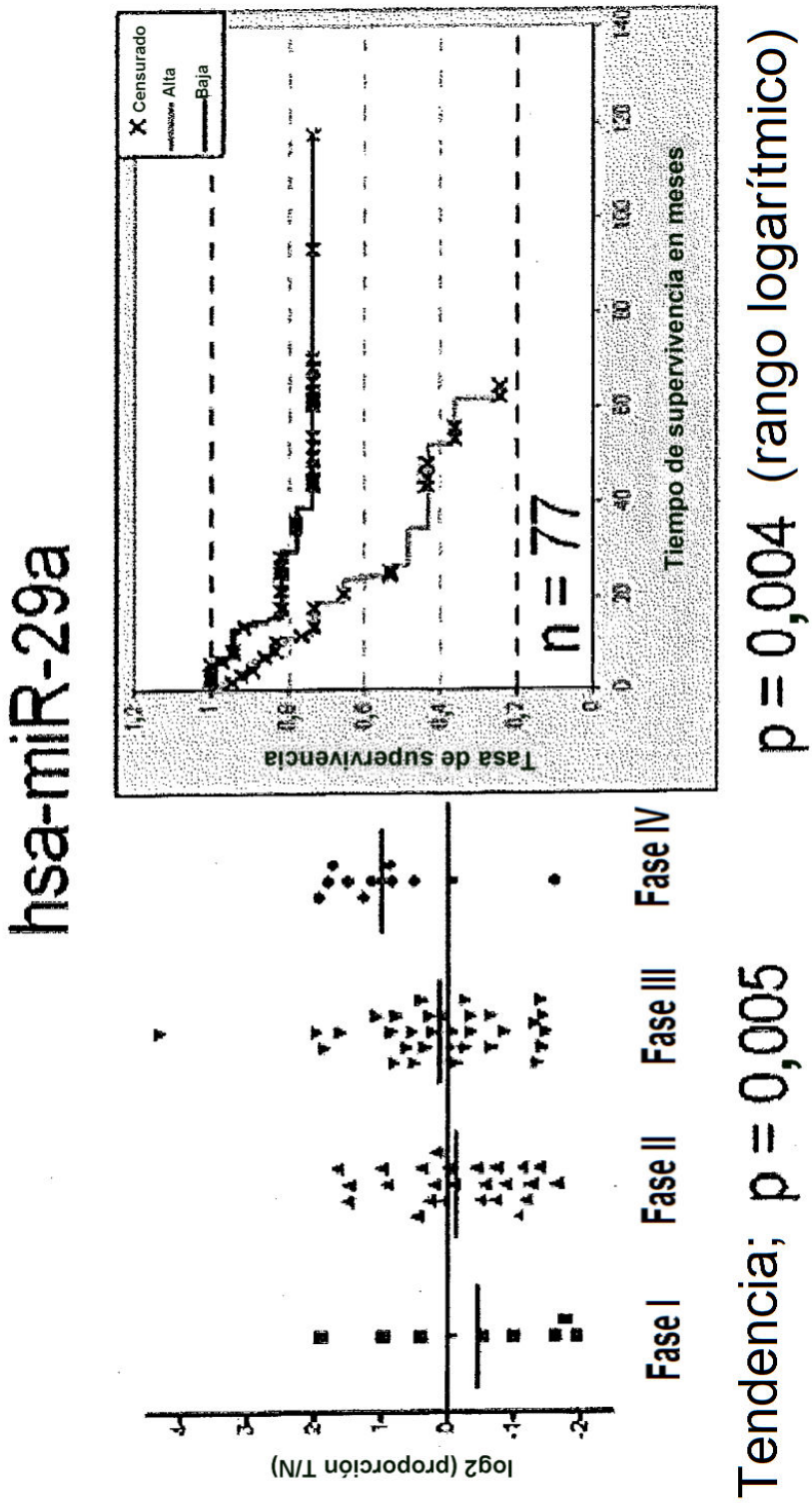

hsa-miR-29a
Censurado
Alta
Baja
Tasa de supervivencia
Tiempo de supervivencia en meses
n = 77
log2 (proporción T/N)
Fase I
Fase II
Fase III
Fase IV
Tendencia; p = 0,005
p = 0,004 (rango logarítmico)
alto basado en la mediana

Figura 8f

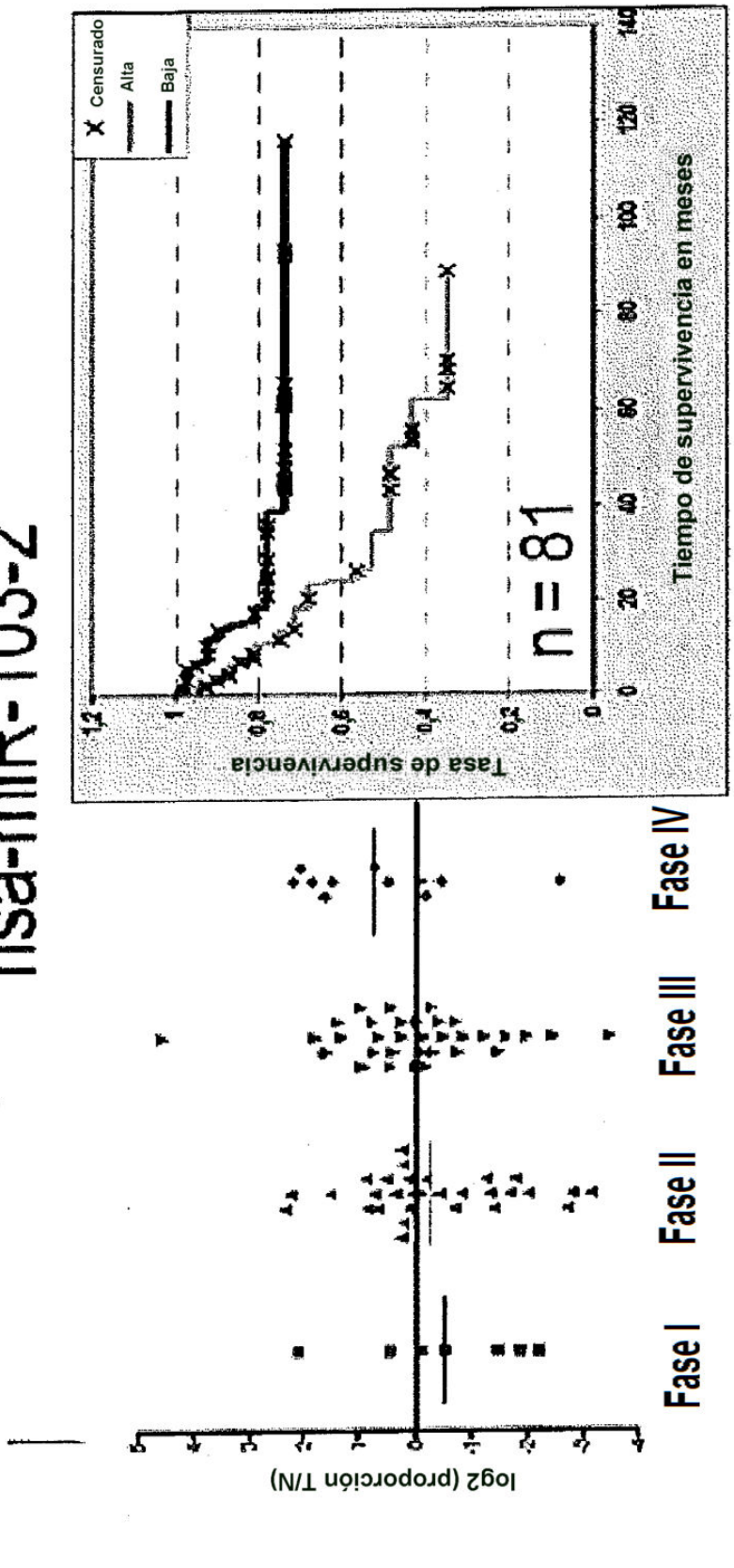

hsa-miR-103-2
Censurado
Alta
Baja
Tasa de supervivencia
n = 81
Tiempo de supervivencia en meses
log2 (proporción T/N)
Fase I
Fase II
Fase III
Fase IV
Tendencia; p = 0,033
p = 0,015 (rango logarítmico)
alto basado en la mediana

Figura 8g

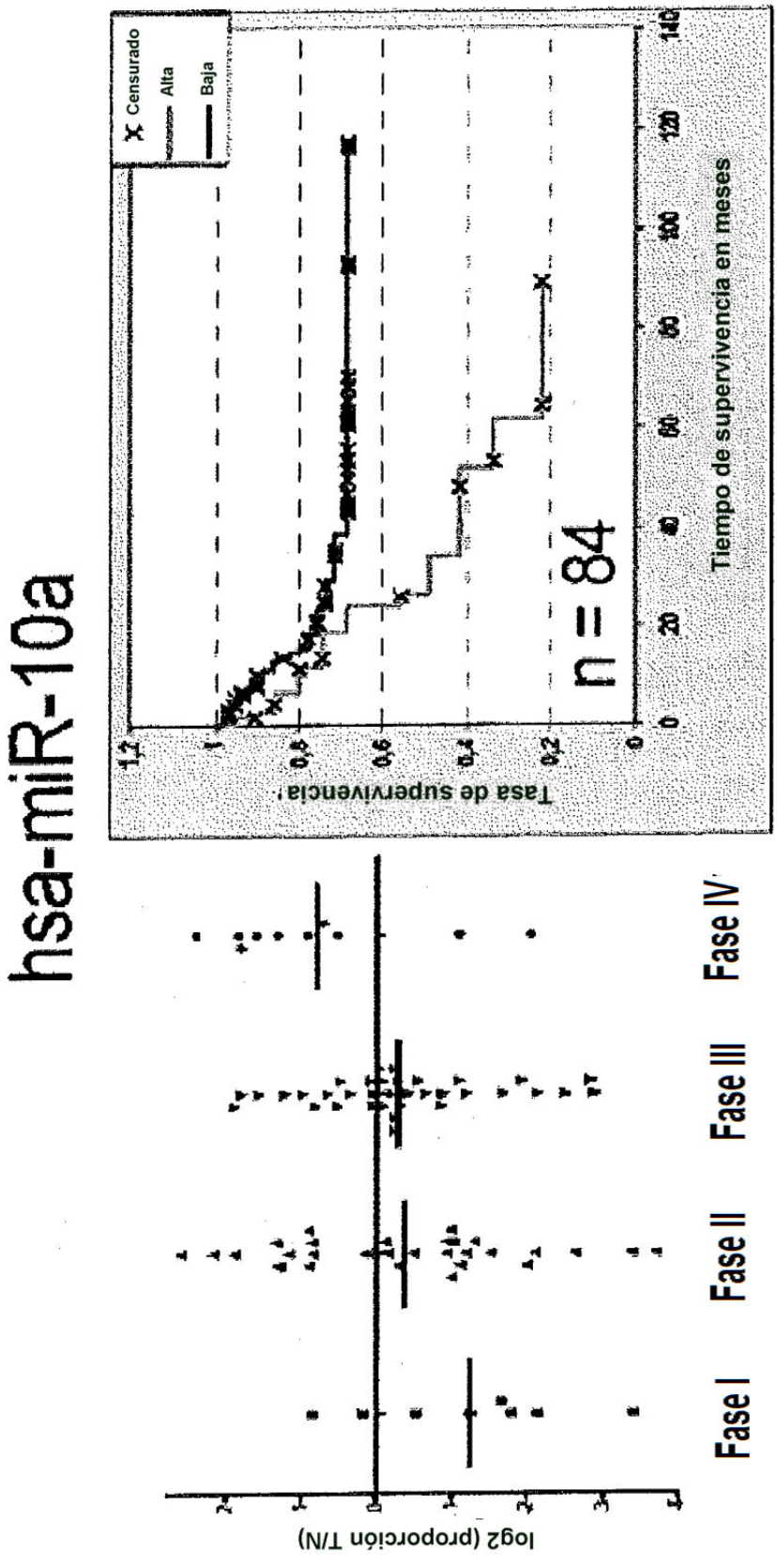

hsa-miR-10a
Censurado
Alta
Baja
Tasa de supervivencia
n = 84
Tiempo de supervivencia en meses
log2 (proporción T/N)
Fase I
Fase II
Fase III
Fase IV
Tendencia; p = 0,008
p = 0,013 (rango logarítmico)
alto basado en el cuartil más alto

Figura 8h

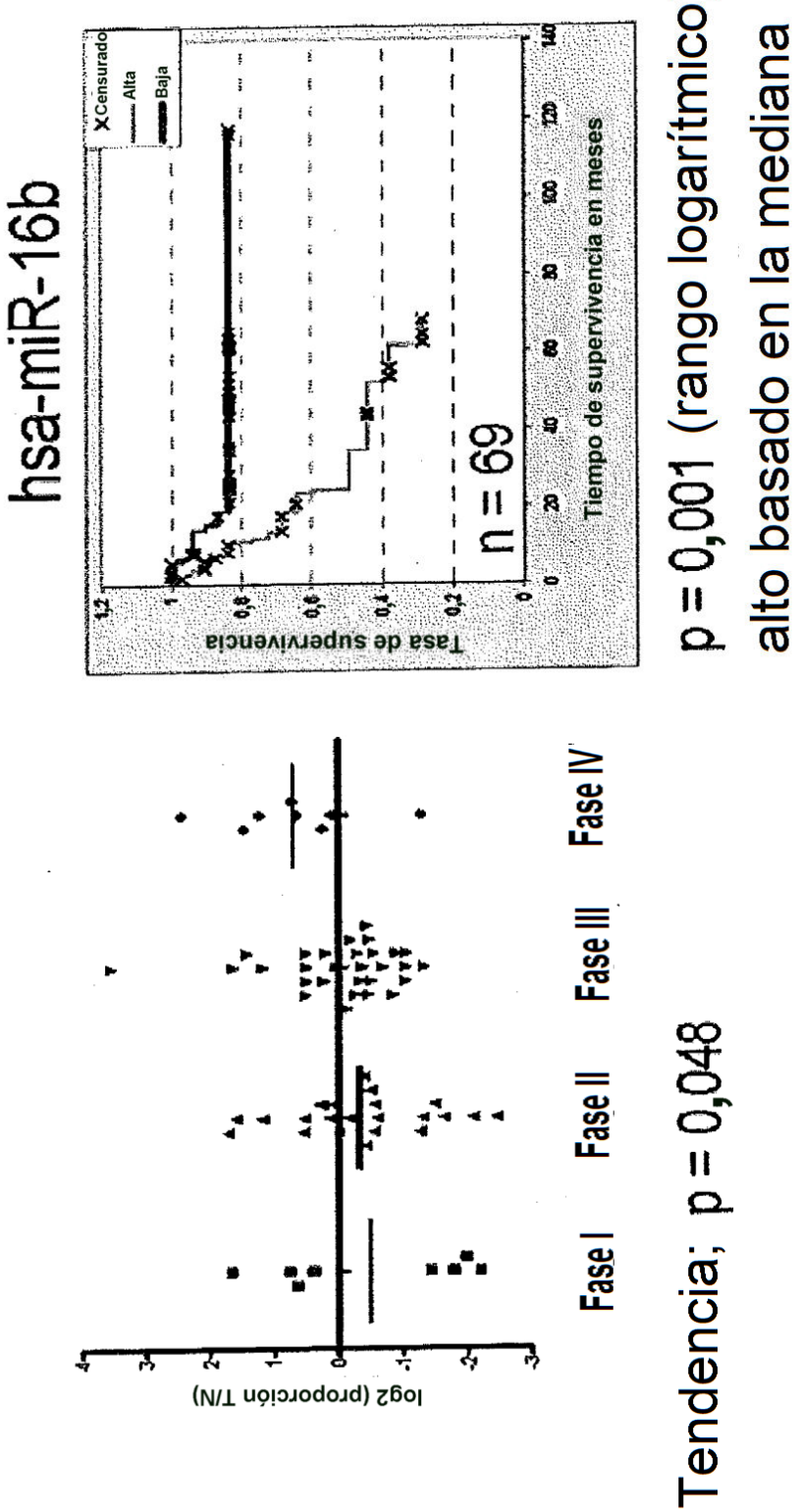

hsa-miR-16b
Censurado
Alta
Baja
Tasa de supervivencia
Tiempo de supervivencia en meses
n = 69
p = 0,001 (rango logarítmico)
alto basado en la mediana
log2 (proporción T/N)
Fase I
Fase II
Fase III
Fase IV
Tendencia; p = 0,048

Figura 8i

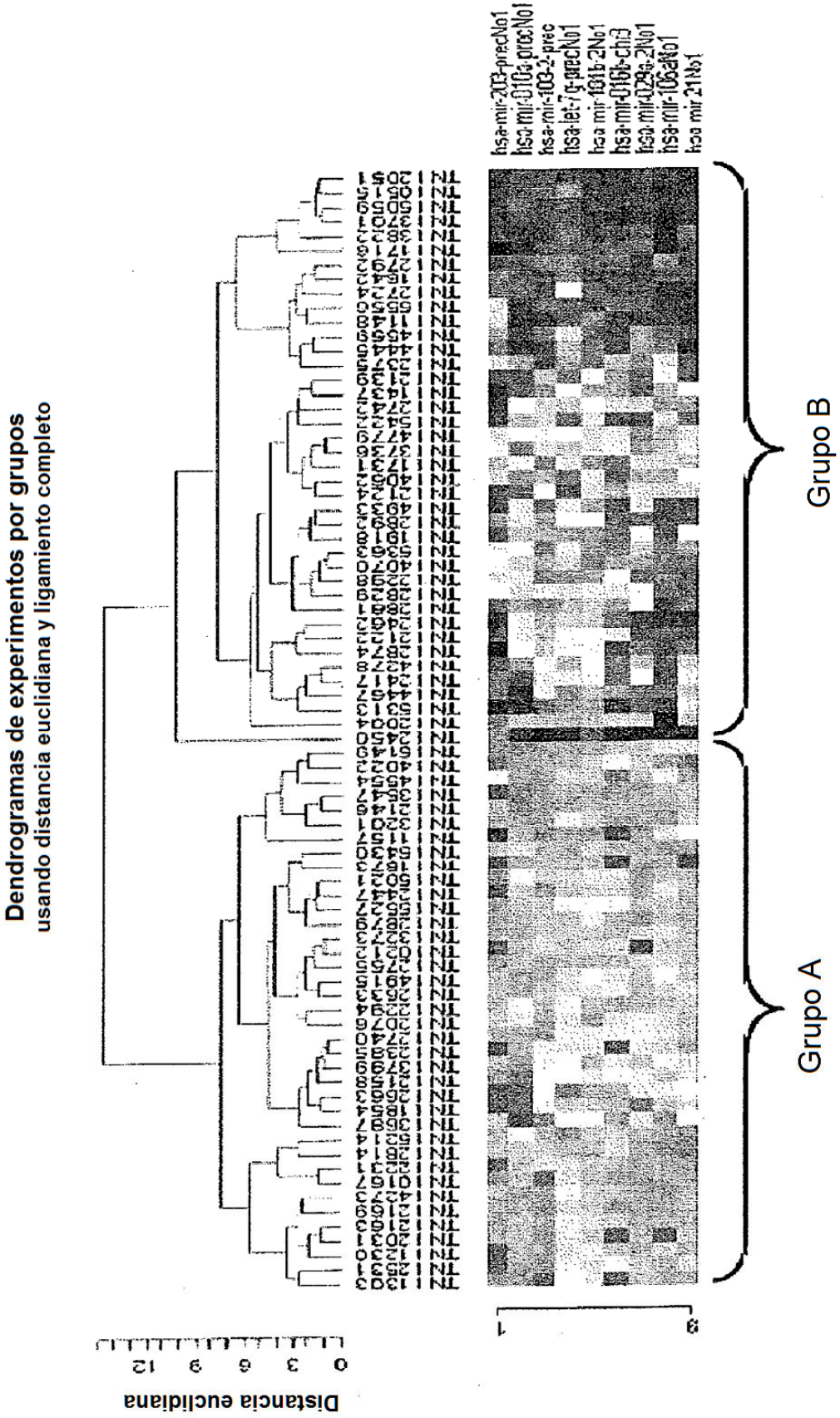

Dendrogramas de experimentos por grupos
usando distancia euclidiana y ligamiento completo
Distancia euclidiana
0
3
6
9
12
hsa-mir-203-precNo1
hsa-mir-010a-precNo1
hsa-mir-103-2-prec
hsa-let-7g-precNo1
hsa-mir-191b-2No1
hsa-mir-016b-chr3
hsa-mir-029a-2No1
hsa-mir-106a-No1
hsa-mir-21No1
1
9
Grupo A
Grupo B

Figura 9a

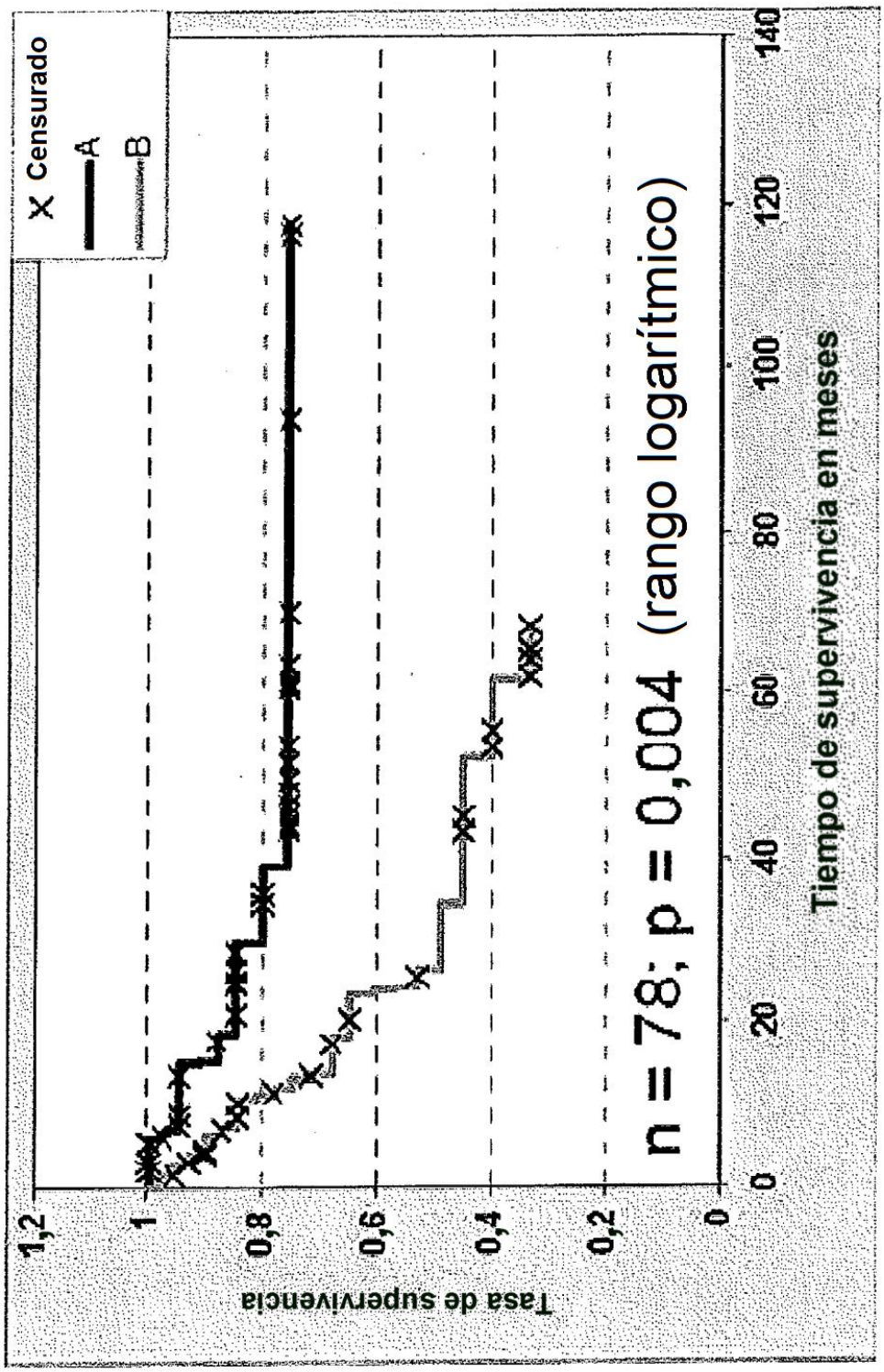

X Censurado
A
B
n = 78; p = 0,004 (rango logarítmico)
Tasa de supervivencia
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Tiempo de supervivencia en meses

Figura 9b