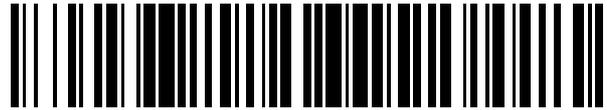


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 890**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2007 E 11196190 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2455492**

54 Título: **Métodos y composiciones basados en micro-ARN para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el colon**

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:  
**14.02.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 442 890 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones basados en micro-ARN para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el colon

5

**Antecedentes de la invención**

El adenocarcinoma de colon es una causa importante de mortalidad por cáncer en todo el mundo<sup>1</sup>. El cáncer colorrectal es la tercera causa más común y la segunda principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos<sup>2</sup>. Los adenocarcinomas de colon esporádicos se inician como adenomas y evolucionan a través de una progresión de cambios moleculares, celulares e histológicos<sup>3</sup>. Aunque las tasas de mortalidad en 5 años han disminuido ligeramente durante las últimas 3 décadas<sup>4</sup>, aún existe una necesidad de identificar nuevos biomarcadores de diagnóstico y dianas terapéuticas para esta enfermedad. Actualmente, la quimioterapia tiene un valor terapéutico significativo pero la cirugía es la única forma curativa de tratamiento<sup>5</sup>.

10

15

Las dianas terapéuticas ideales se deberían asociar causalmente con la enfermedad y son susceptibles de diseño de intervenciones terapéuticas; mientras que los biomarcadores ideales deberían ser fáciles de medir y tienen fuertes asociaciones con los resultados clínicos. Los microARN podrían combinar ambos criterios<sup>6-8</sup>.

20

Los microARN son moléculas de ARN no codificante, de 18-25 nucleótidos que regulan la traducción de muchos genes<sup>9</sup>. Desde su descubrimiento<sup>10, 11</sup>, se ha encontrado que regulan diversos procesos celulares que incluyen la apoptosis<sup>12-14</sup>, diferenciación<sup>10, 11, 15</sup> y proliferación celular<sup>16</sup>. Los microARN también pueden desempeñar un papel causal en la carcinogénesis<sup>6, 17</sup>. Los niveles de expresión de microARN están alterados en la mayoría de los tipos de tumores<sup>18, 19</sup>, que incluyen los tumores de colon<sup>19-22</sup>. Los microARN miR-15 y miR-16a están suprimidos o regulados negativamente en la mayoría de las leucemias linfocíticas crónicas<sup>23</sup>. La manipulación experimental de microARN específicos modula el desarrollo tumoral en sistemas de modelos de ratón<sup>16, 24-26</sup>. También se ha demostrado el potencial pronóstico de micro-ARN para la leucemia linfocítica crónica<sup>7</sup>, cáncer de pulmón<sup>8</sup> y neuroblastomas<sup>27</sup>.

25

La expresión anómala de los microARN puede ser causal a la carcinogénesis, y la inhibición de microARN específicos puede tener implicaciones terapéuticas. Se pueden diseñar oligonucleótidos antisentido modificados para inhibir específicamente la función de microARN<sup>28</sup>. Los antagómicos son un tipo de oligonucleótidos antisentido que se ha probado que son eficaces en la inhibición de la función de microARN *in vivo* en ratones<sup>29</sup>. La facilidad para diseñar inhibidores específicos de la función de microARN los hace candidatos para dianas terapéuticas.

30

**Sumario de la invención**

35

La invención se refiere a un método para diagnosticar si un sujeto tiene un adenocarcinoma de colon con un mal pronóstico de supervivencia, que comprende:

40

medir el nivel de menos un producto génico de miR-181 b en una muestra de ensayo del sujeto en el que dicho sujeto tiene un adenocarcinoma de colon, en el que un aumento en al menos el nivel del producto génico de miR-181b en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico de miR-181 b correspondiente en una muestra de control, es indicativo de que el sujeto tiene un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia.

45

La invención también se refiere a un método para someter a ensayo un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia, que comprende:

50

(1) determinar un nivel de expresión de al menos un marcador en una muestra de un sujeto de ensayo que tiene adenocarcinoma de colon; y él al menos un marcador incluye al menos un producto génico de miR-181 b;  
(2) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa (1) con un nivel de expresión de control del marcador en una muestra de un sujeto sano; y  
(3) considerar que el sujeto tiene un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia cuando el resultado de la comparación en la etapa (2) indica que:

55

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

La invención también se refiere a un método para diagnosticar si un sujeto tiene adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia, que comprende:

60

(1) transcripción inversa del ARN a partir de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana en la que dicho sujeto tiene adenocarcinoma de colon;  
(2) hibridar los oligodesoxinucleótidos diana a una micromatriz que comprende oligonucleótidos de sonda específica miARN-181b 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 de control,

65

en el que un aumento en la señal del miR-181b es indicativo de que el sujeto tiene adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia.

5 La muestra de que comprender una o más de tejido, sangre, plasma, suero, orina, y heces. Además, todas las etapas del método se pueden realizar *in vitro*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 de modo que la tumorigénesis se inhibe en el sujeto.

55 En un aspecto en particular, el al menos un producto génico de miR aislado en la etapa (i) es miR-21 o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo. Además, en determinadas realizaciones, el al menos un producto génico de miR en la etapa (ii) está seleccionado entre el 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 del mismo.

60 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un método para identificar un inhibidor de la tumorigénesis, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con una expresión alterada de los niveles en una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que un aumento o disminución en el nivel del producto génico de miR en la célula, con respecto a una célula de control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de la tumorigénesis.

65

5 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un método para identificar un inhibidor de la tumorigénesis, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con una expresión alterada del nivel en una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que una disminución en el nivel del producto génico de miR en la célula, con respecto a una célula de control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de la tumorigénesis.

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

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

20 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un método para identificar un potencial para el inicio o desarrollo de al menos una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un sujeto, método que proporciona la medida de uno o más de los marcadores que se describen 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*.

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

30 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un reactivo para someter a ensayo una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que el reactivo comprende un anticuerpo que reconoce una proteína codificada por al menos un marcador que se describe en el presente documento.

35 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un chip de ADN para someter a ensayo una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que una sonda se ha inmovilizado para evaluar al menos un marcador que se describe en el presente documento.

40 En otro amplio aspecto, 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 el cáncer de colon que comprende:

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

2) determinar el nivel de eficacia del tratamiento que se está sometiendo a ensayo en el tratamiento o prevención de la enfermedad relacionada con el cáncer de colon mediante la evaluación de al menos un marcador que se describe en el presente documento.

45 En determinadas realizaciones, el agente terapéutico candidato comprende uno o más de: composiciones farmacéuticas, composiciones nutracéuticas, y composiciones homeopáticas. Además, la terapia que se está evaluando puede ser para uso en un sujeto humano. En determinadas realizaciones, el método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

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

55 1) medir uno o más de los marcadores de regulación por aumento o disminución que se describen en el presente documento después de la exposición del animal a uno o más materiales en cantidades suficientes para iniciar una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon response en el animal; y

60 2) determinar si al menos uno de los marcadores de regulación por aumento o disminución tiene la capacidad de iniciar una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

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

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

10 En otro amplio aspecto, 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 el cáncer de colon seleccionado entre al menos uno de los marcadores que se describen en el presente documento.

15 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un kit para identificación sistemática de un compuesto candidato para un agente terapéutico para tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que el kit comprende: uno o más represivos de al menos un marcador que se describe en el presente documento, y una célula que expresa al menos un marcador. En determinadas realizaciones, la presencia del marcador se detecta usando un reactivo que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente con al menos un marcador. Además, en determinadas realizaciones, el reactivo está marcado, radiomarcado, o marcado con biotina, y/o el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está radiomarcado, marcado con cromóforos, marcado con fluoróforos, o marcado con enzimas. En una realización en particular, el kit incluye adicionalmente un envase que comprende al menos uno de los marcadores. Además, el reactivo puede comprender uno o más de: un anticuerpo, una sonda a la que el reactivo está unido o se puede unir, y un quelato de metal inmovilizado.

20 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un ensayo para la identificación sistemática de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon que comprende:

25 poner en contacto uno o más de los marcadores con un sustrato para dicho marcador con un agente de ensayo, y determinar si el agente de ensayo modula la actividad del marcador.

30 En determinadas realizaciones, todas las etapas del método se pueden realizar *in vitro*.

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

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

40 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un método para tratar, prevenir, invertir o limitar la gravedad de una complicación de la enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un individuo con necesidad del mismo, que comprende:

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

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

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

60 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona el uso de un agente que interfiere con al menos una cascada de respuestas a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon, para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir, invertir o limitar la gravedad de una complicación de la enfermedad relacionada

con el cáncer de colon en un individuo, en el que el agente comprende al menos un producto génico de miR seleccionado entre el grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-105a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

5 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un medio de lectura por ordenador que comprende una base de datos que tiene una pluralidad de perfiles de referencias codificadas 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 a partir de uno o más sujetos que presentan un indicio de una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon,

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

15 En determinadas realizaciones, el medio de lectura 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 indicios de una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon; o sujetos que tienen una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

20 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un sistema de ordenador para determinar si un sujeto tiene, está predispuesto a tener, o tiene un mal pronóstico de supervivencia para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, que comprende la base de datos que se describe en el presente documento, y un servidor que comprende un código ejecutable por ordenador para hacer que el ordenador reciba un perfil de un sujeto, identificar a partir de la base de datos perfil de referencia de coincidente que es diagnósticamente relevante para el perfil del sujeto, y generar una indicación de si el sujeto tiene, o está predispuesto a tener, una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

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

30 1) proporcionar un ordenador que comprende un modelo o algoritmo para clasificar datos a partir de una muestra obtenida del sujeto, en el que la clasificación incluye analizar los datos para la presencia, ausencia o cantidad de al menos un marcador, en el que el marcador comprende uno o más productos génicos de miR seleccionados entre el grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos

35 2) introducir datos a partir de la muestra biológica obtenida del sujeto; y,

3) clasificar la muestra biológica por indicar la presencia, ausencia, naturaleza o extensión de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

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

45 En otro amplio aspecto, en el presente documento se proporciona un modelo animal para cáncer de colon en el que al menos uno de los siguientes procesos biológicos o químicos que se producen en el modelo animal mediante regulación por aumento o disminución de uno o más productos génicos de miR está seleccionado entre el 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 en particular, el modelo animal es un

50 ratón, rata, conejo, o primate.

Diversos objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferente, cuando se lee a la luz de los dibujos adjuntos.

### 55 **Breve descripción de los dibujos**

La patente o el expediente de la solicitud de la aplicación contienen al menos un dibujo realizado en color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos en color las proporcionará la Oficina a solicitud y pago de la tasa necesaria.

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

65 (Fig. 1a) La hibridación in situ de miR-21 se optimizó para distinguir la expresión elevada y baja de miR-21. Células epiteliales de colon en tumor humano (T) expresan niveles más altos de miR-21 en comparación con el tejido adyacente no tumoral (N). (Fig. 1c) Núcleos y citoplasma de células epiteliales de colon en tejido tumoral expresan

cantidades significativas de miR-21 en tejido tumoral, con aumento elevado. (Fig. 1e) El tejido no tumoral no muestra expresión significativa de miR-21 con el mismo aumento.

(Fig. 1b, Fig. 1d, Fig. 1f) La sonda de control de codificación no muestra tinción significativa con aumento elevado o bajo en secciones en serie de tejido tumoral y no tumoral, tal como se esperaba. Las barras a escala (Figs. 1c-f) indican que miR-21 500  $\mu$ M (g) se expresa a niveles más altos en tumores más avanzados. Las representaciones de puntos representan los valores de Ct con respecto a miR-21 (a partir de RT-PCR cuantitativa) para niveles de adenoma y expresión tumoral que se han normalizado la tejido de no adenoma o no tumoral emparejados, respectivamente. Los tipos de tejido se han ordenado a partir de adenoma a tumores en estadios I-IV. Las barras indican valores medios. Existe una tendencia significativa de que los tumores más avanzados tienen una expresión mayor de miR-21 (ensayo no paramétrico para la tendencia a través de grupos ordenados).

Figura 2: miR-21 se expresa a niveles más altos en tumores más avanzados. Se usaron micromatrices de microARN para medir los niveles de expresión de miR-21. Las presentaciones de puntos representan el  $\log_2$  miR-21 (relaciones tumorales/no tumorales) tal como se calcula a partir de micromatrices de microARN a partir de la cohorte original. La sonda hsa-miR-21-prec 17No 1 de la micromatriz se usó para medir la expresión de miR-21. Se excluyeron los tejidos con expresión indetectable de miR-21 basándose en los datos de la micromatriz. Los tipos de tejido se han ordenado a partir de tumores del estadio I al estadio IV de TNM. Las barras indican valores medios. Existe una tendencia significativa de que los tumores más avanzados tienen una expresión mayor de miR-21 ( $p = 0,04$ ; ensayo no paramétrico para la tendencia a través de grupos ordenados).

Figuras 3a y 3b; Una expresión de miR-21 elevada en tumores predice una baja supervivencia en sujetos con histología típica de adenocarcinoma en ambas poblaciones base independientes. Este análisis excluye sujetos con histología de adenocarcinoma mucinoso o de carcinoma adenoescamoso.

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

(Fig. 3b) Validación de la asociación con la expresión de miR-21 elevada en tumores y mal pronóstico en una cohorte independiente. Los niveles de expresión de miR-21 se midieron por RT-PCR cuantitativa. La expresión elevada se basa en el tercil más elevado. 35/103 tejidos no tumorales se clasificaron como alto y 34/103 tejidos tumorales clasificaron como alto. Los valores p son valores p de nivel logarítmico a partir de análisis de Kaplan-Meier. Las x en todas las líneas indican el momento en el que un individuo fue censurado.

Figuras 4a y 4b: La expresión de miR-21 elevada en tumores predice mala supervivencia en ambas poblaciones base independientes. Este análisis incluye a todos los sujetos independientemente de la histología de adenocarcinoma.

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

(Fig. 4b) Validación de la asociación con la expresión de miR-21 elevada en tumores y mal pronóstico en una cohorte independiente. Los niveles de expresión de miR-21 se midieron por RT-PCR cuantitativa. La expresión elevada se basa en el tercil más elevado. 37/111 tejidos no tumorales se clasificaron como alto y 37/111 tejidos tumorales clasificaron como alto. Los valores p son valores p de nivel logarítmico a partir de análisis de Kaplan-Meier. Las x en todas las líneas indican el momento en el que un individuo fue censurado.

Figuras 5a, 5b y 5c: La expresión de miR-21 elevada está asociada con una mala respuesta a la quimioterapia adyuvante para casos con histología de adenocarcinoma convencional. Este análisis incluye los sujetos a partir la cohorte de validación, excluyendo los sujetos con histologías de adenocarcinoma mucinoso a carcinoma adenoescamoso.

(Fig. 5a) Comparación de tasas de supervivencia para sujetos en estadio II/III de TNM con histología de adenocarcinoma convencional mediante niveles expresión de miR-21 recepción de quimioterapia adyuvante. Para los 77 sujetos en estadio II/III, 25 se clasificaron como terapia de recepción de miR-21 baja, 28 como miR-21 bajo y sin recibir terapia, 11 como terapia de recepción de miR-21 alta, y 13 como miR-21 alto y sin recibir terapia. Para los

sujetos en estadio II/III que recibieron quimioterapia adyuvante, la expresión de miR-21 elevada en tumores está asociada con una escasa supervivencia ( $p = 0,03$ ).

5 (Fig. 5b) Comparación de sujetos en estadio II de TNM con histología de adenocarcinoma convencional. Para los 33 sujetos en estadio II, 8 se clasificaron como terapia de recepción de miR-21 baja, 15 como miR-21 bajo y sin recibir terapia, 3 como terapia de recepción de miR-21 alta, y 7 como miR-21 alto y sin recibir terapia. Todos los sujetos en estadio II que recibieron quimioterapia sobrevivieron durante la duración de este estudio.

10 (Fig. 5c) Comparación de sujetos en estadio III de TNM con histología de adenocarcinoma convencional. Para los 44 sujetos en estadio III, 17 se clasificaron como terapia de recepción de miR-21 baja, 13 como miR-21 bajo y sin recibir terapia, 8 como terapia de recepción de miR-21 alta, y 6 como miR-21 alto y sin recibir terapia. Para los sujetos en estadio III que recibieron quimioterapia adyuvante, la expresión de miR-21 elevada en tumores está asociada con una escasa supervivencia ( $p = 0,02$ ). Las x en todas las líneas indican el momento en el que un individuo fue censurado.

15 Figuras 6a, 6b y 6c: Análisis combinado de cohorte del ensayo de Maryland y 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 estadio II/III de TNM a partir de ambas poblaciones base. Se excluyeron los individuos con histologías de adenocarcinoma mucinoso a carcinoma adenoescamoso. La columna izquierda incluye representaciones de Kaplan-Meier que analizan la asociación entre recepción de terapia adyuvante y pronóstico. La columna central incluye análisis de la asociación entre expresión de miR-21 elevada en tumores y pronóstico, y la columna de la derecha subdivide a los individuos en base tanto al estado de quimioterapia como de expresión de miR-21.

25 (Fig. 6a) Todos los sujetos en estadio II/III de TNM. Para los 119 sujetos en estadio II/III, 40 se clasificaron como terapia de recepción de miR-21 baja, 41 como miR-21 bajo y sin recibir terapia, 16 como terapia de recepción de miR-21 alta, y 22 como miR-21 alto y sin recibir terapia. La expresión de miR-21 elevada está asociada con una escasa supervivencia para los que recibieron quimioterapia ( $p = 0,003$ ) así como para los que no recibieron quimioterapia ( $p = 0,04$ ).

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

35 (Fig. 6c) Todos los sujetos en estadio III de TNM. Para los 67 sujetos en estadio III, 30 se clasificaron como terapia de recepción de miR-21 baja, 16 como miR-21 bajo y sin recibir terapia, 12 como terapia de recepción de miR-21 alta, y 9 como miR-21 alto y sin recibir terapia. La expresión de miR-21 elevada está asociada significativamente con escasa supervivencia en los sujetos en estadio III que recibieron quimioterapia ( $p = 0,007$ ), pero no en los sujetos que no recibieron quimioterapia ( $p = 0,30$ ). Las x en todas las líneas indican el momento en el que un individuo fue censurado.

45 Figuras 7a - 7c. Los perfiles de miARN global están asociados con la estadificación clínica de TNM y pronóstico de supervivencia. La agrupación jerárquica de las relaciones TIN de miARN dieron como resultado la formación de dos grupos denominados arbitrariamente grupo A y grupo B. El mapa HEAT y las asignaciones de grupo resultantes se muestran en la Fig. 7a. Estos dos grupos estaban compuestos de individuos con pronósticos de supervivencia diferentes para la estadificación de TNM con individuos del grupo B con más probabilidad de ser diagnosticados como estadio III o IV en comparación con los individuos del grupo A (Fig. 7b). El análisis de Kaplan-Meier muestra que los individuos de Grupo B también tienen un pronóstico de supervivencia peor (Fig. 7c).

50 Figuras 8a - 8i. Las relaciones de TIN de los miARN individuales son predictivos del pronóstico de supervivencia. Aquí se presentan gráficos que muestran relaciones de TIN mediante estadificación de TNM (izquierda) y análisis de Kaplan-Meier (derecha) para cada uno de estos 9 miARN. El eje Y (relación TIN mediante gráficos de estadificación de TNM) indica la relación TIN transformada por  $\log(2)$  para cada individuo mientras que el eje Y agrupa los individuos mediante estadificación de TNM (I, II, III o IV). Los valores significativos mostrados son el resultado de un ensayo no paramétrico para la tendencia de los valores medios de la relación TIN promedio para los individuos agrupados mediante estadificación. Las representaciones de Kaplan-Meier incluyen a todos los individuos con datos de relación TIN para un miARN en particular. Nosotros encontramos que las relaciones TIN estaban asociadas tanto con la estadificación clínica como con el pronóstico de supervivencia.

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

de muerte por cáncer de colon que el grupo A. Los individuos se excluyeron de este análisis si fracasaban en más de 2 de las 9 relaciones TIN que componen la firma de mARN.

**Descripción detallada de la realización preferente**

5 La invención se refiere a un método para diagnosticar si el sujeto tiene un mal pronóstico de supervivencia a adenocarcinoma de colon, que comprende:

10 medir el nivel de al menos un producto génico de miR-181b en una muestra de ensayo del sujeto en el que dicho sujeto tiene adenocarcinoma de colon, en el que un aumento en al menos el nivel del producto génico de miR-181b en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico de miR-181b correspondiente en una muestra de control, es indicativo de que el sujeto tiene adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia.

15 La invención también se refiere a un método para someter a ensayo un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia, que comprende:

- 20 (1) determinar un nivel de expresión de al menos un marcador en una muestra de un sujeto de ensayo que tiene adenocarcinoma de colon; incluyendo el al menos un marcador al menos un producto génico de miR-181b;  
 (2) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa (1) con un nivel de expresión de control del marcador en una muestra de un sujeto sano; y  
 (3) considerar que el sujeto tiene un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia cuando el resultado de la comparación en la etapa (2) indica que:

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

La invención también se refiere a un método para diagnosticar si el sujeto tiene adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia, que comprende:

- 30 (1) transcribir inversamente el ARN a partir 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 a una micromatriz que comprende oligonucleótidos de sonda específica de miRNA-181b para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y  
 35 (3) comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control,

en el que un aumento de la señal del miR-181b es indicativo de que el sujeto tiene adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia.

40 Tal como se usa en el presente documento de forma intercambiable, un "producto génico de miR," "microARN," "miR," o "miARN" se refiere al transcrito de ARN sin procesar (por ejemplo, precursor) o procesado (por ejemplo, maduro) de un gen de miR. Dado que los productos génicos de miR no se traducen en proteínas, el término "productos génicos de miR" no incluye proteínas. El transcrito génico de miR sin procesar también se denomina "precursor de miR" o "prec miR" y por lo general comprende un transcrito de ARN de aproximadamente 70-100  
 45 nucleótidos de longitud. El precursor de miR se puede procesar mediante digestión con una RNAsa (por ejemplo, Dicer, Argonaut, o RNAsa III (por ejemplo, RNAsa III de *E. coli*)) en una molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activos. Esta molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activos también se denomina transcrito génico de miR "procesado" o miARN "maduro".

50 La molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activos se puede obtener a partir del precursor de miR a través de rutas de procesamiento natural (*por ejemplo*, usando células intactas o lisados de células) o mediante rutas de procesamiento sintético (*por ejemplo*, usando enzimas de procesamiento aislado, tales como Dicer, Argonaut, o RNAsa III aisladas). Se entiende que la molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activos también se puede producir directamente mediante síntesis biológica o química, sin haber sido procesada a partir del precursor de miR. Cuando  
 55 en el presente documento se hace referencia a un microARN por el nombre, que no me corresponde a las formas tanto precursora como madura, a menos que se indique de otro modo.

60 En un aspecto, en el presente documento se proporcionan métodos para diagnosticar si el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer de colon, que comprende medir el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo del sujeto y comparar el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control. Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" puede ser cualquier mamífero que tiene, o que se sospecha que tienen, un cáncer sólido. En una realización preferente, el sujeto es un ser humano que tiene, o que se sospecha que tiene, un cáncer de colon.

65 En una realización, el al menos un producto génico de miR medido en la muestra de ensayo está seleccionado entre el grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos. En una

realización en particular, el producto génico de miR es miR-21.

La enfermedad relacionada con el cáncer de colon cualquier trastorno o cáncer que se presenta en los tejidos de colon. Dichos cánceres por lo general están 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 de miR medido en la muestra de ensayo está seleccionado entre el grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

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

El nivel de al menos un producto génico de miR se puede medir en una muestra biológica (por ejemplo, células, tejidos) obtenidos del sujeto. Por ejemplo, una muestra de tejido (por ejemplo, a partir de un tumor) se puede retirar de un sujeto del que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon mediante técnicas convencionales de biopsia. En otra realización, una muestra de sangre se puede retirar del sujeto, y células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos) se pueden aislar para la extracción de ADN mediante técnicas convencionales. La muestra de sangre o de tejido se obtiene preferentemente del sujeto antes del inicio de radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento terapéutico. Una muestra de tejido o de sangre de control correspondiente se puede obtener a partir de tejidos sin afectar del sujeto, a partir de un individuo humano normal o población de individuos normales, o a partir de células cultivadas corresponden a la mayoría de las células en la muestra del sujeto. La muestra de tejido o de sangre de control se procesa a continuación junto con la muestra del sujeto, de modo que los niveles de producto génico de miR producidos a partir de un gen de miR dado en células de la muestra del sujeto se pueden comparar con los niveles correspondientes de producto génico de miR a partir de células de la muestra de control. Un patrón de expresión de miR de referencia para la muestra biológica también se puede usar como un control.

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

En una realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra de control (es decir, la expresión del producto génico de miR está "regulada positivamente"). Tal como se usa en el presente documento, la expresión de un producto génico de miR está "regulada positivamente" cuando la cantidad de producto génico de miR en una célula o muestra de tejido de un sujeto es mayor que la cantidad del mismo producto génico en una muestra de célula o tejido de control.

En otra realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra de control (es decir, la expresión del producto génico de miR está "regulada negativamente"). Tal como se usa en el presente documento, la expresión de un gen de miR está "regulada negativamente" cuando la cantidad de producto génico de miR a partir de ese gen en una célula o muestra de tejido de un sujeto es menor que la cantidad producida a partir del mismo gen en una muestra de célula o tejido de control.

La expresión genética de miR relativa en las muestras de control y normal se puede determinar con respecto a uno o más patrones de expresión de ARN. Los patrones pueden comprender, por ejemplo, un nivel de expresión genética de miR cero, el nivel de expresión genética de miR en una línea celular convencional, el nivel de expresión genética de miR en tejidos del sujeto sin afectar, o el nivel medio de expresión genética de miR obtenido previamente para una población de controles humanos normales.

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

Sondas adecuadas para la hibridación de Northern blot de un producto génico de miR dado se pueden producir a partir de las secuencias de ácidos nucleicos e incluyen, pero no se limitan a, sondas que tienen una complementariedad de al menos aproximadamente un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un 99 % o total de un producto génico de miR de interés. Métodos para la preparación de sondas marcadas de ADN y de ARN, y las condiciones para la hibridación de las mismas a secuencias de nucleótidos diana, se describen en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook y col., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulos 10 y 11.

En un ejemplo no limitante, la sonda de ácido nucleico puede estar marcada con, por ejemplo, un radionucleido, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ , o  $^{35}\text{S}$ ; un metal pesado; obligando capaz de funcionar como un miembro de unión del par específico para un ligando marcado (*por ejemplo*, biotina, avidina o un anticuerpo); una molécula fluorescente; una molécula quimioluminiscente; una enzima o similar.

Las sondas se pueden marcar para una actividad específica mediante el método de traslado de corte de Rigby y col. (1977), *J. Mol. Biol.* 113: 237-251 o mediante el método de cebado aleatorio de Fienberg y col. (1983), *Anal. Biochem.* 132: 6-13. El último es el método de elección para sintetizar sondas marcadas con  $^{32}\text{P}$  de actividad específica elevada de ADN monocatenario o de moldes de ARN. Por ejemplo, mediante el reemplazo de nucleótidos preexistentes con nucleótidos altamente radiactivos de acuerdo con el método de traslado de corte, es posible preparar sondas de ácidos nucleicos marcados con  $^{32}\text{P}$  con una cantidad específica muy por encima de  $10^8$  cpm/microgramo. La detección autorradiográfica de la hibridación se puede realizar a continuación mediante la exposición de filtros hibridados la película fotográfica. El barrido densitométrico de las películas fotográficas expuestas mediante los filtros hibridados proporciona una medida precisa de los niveles de transcrito génico de miR. Usando otro enfoque, los niveles de transcrito génico de miR se pueden cuantificar mediante sistemas de formación de imágenes por ordenador, tales como el Phosphorimager 400-B 2D de Molecular Dynamics disponible en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

Cuando el marcado de sondas de ADN o de ARN con radionucleidos no es práctico, el método de cebador aleatorio para incorporar un análogo, por ejemplo, el trifosfato de 5-(N-(N-biotinil-epsilon-aminocaproil)-3-aminoalil) desoxiuridina análogo de dTTP, en la molécula sonda. El oligonucleótido sonda biotinilada se puede detectar por reacción con proteínas de unión a biotina, tales como avidina, estreptavidina, y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-biotina) acopladas a colorantes o enzimas fluorescentes que producen reacciones de color.

Además de Northern y otras técnicas de hibridación de ARN, la determinación de los niveles de transcritos de ARN se puede realizar 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 cobre objetos de microscopio e investigar el contenido de ácidos nucleicos de la célula con una solución que contiene sondas de ácidos nucleicos radiactivos o marcados de otro modo (por ejemplo, ADNc o ARN). Esta técnica es particularmente muy adecuada para analizar muestras de biopsia de tejido de sujetos. La práctica de la técnica de hibridación *in situ* se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos N° 5.427.916.

En un ejemplo no limitante, las sondas adecuadas para hibridación *in situ* de un producto génico dado de miR se pueden producir a partir de las secuencias de ácidos nucleicos, e incluyen, pero no se limitan a, sondas que tienen una complementariedad de al menos aproximadamente un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un 99 % o total de un producto génico de miR de interés, tal como se ha descrito anteriormente.

El número relativo de transcritos génicos de miR en células también se puede determinar por transcripción inversa de transcritos génicos de miR, seguido de amplificación de los transcritos traducidos de forma inversa mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los niveles de transcritos génicos de miR se pueden cuantificar en comparación con un patrón interno, por ejemplo, el nivel de mRNA a partir de un gen "constitutivo" presente en la misma muestra. Un gen "constitutivo" adecuado para uso como un patrón interno incluye, por ejemplo, miosina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Métodos para realizar RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa, y variaciones de las mismas, son bien conocidos por los expertos en la materia.

En algunos casos, puede ser deseable determinar simultáneamente del nivel de expresión de una pluralidad de diferentes productos génicos de miR en una muestra. En otros casos, puede ser deseable determinar el nivel de expresión de los transcritos de todos los genes conocidos de miR correlacionados con un cáncer. La evaluación de los niveles de expresión específicos de cáncer para cientos de genes o productos génicos de miR necesita mucho tiempo y requiere una gran cantidad de ARN total (por ejemplo, al menos 20  $\mu\text{g}$  para cada Northern blot) y técnicas autorradiográficas que requieren isótopos radiactivos.

Para superar estas limitaciones, se puede construir una oligobiblioteca, en formato microchip (es decir, una micromatriz), que contenga un conjunto de sondas de oligonucleótidos (por ejemplo, oligodesoxinucleósido) que son específicas para un conjunto de genes de miR. Usando dicha micromatriz, el nivel de expresión de múltiples microARN en una muestra biológica se puede determinar mediante la transcripción inversa de los ARN para generar un conjunto de oligodesoxinucleósido diana, e hibridándolos para sondear los oligonucleótidos en la micromatriz para generar un perfil de hibridación, o de expresión. El perfil de hibridación de la muestra de ensayo se puede

comparar a continuación con el de una muestra de control para determinar que los microARN tienen un nivel de expresión alterada en células de cáncer sólido.

5 Tal como se usa en el presente documento, "oligonucleótido sonda" u "oligodesoxinucleótido sonda" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse en un oligonucleótido diana. "Oligonucleótido diana" u "oligodesoxinucleótido diana" se refiere a una molécula a detectar (por ejemplo, a través de hibridación). Mediante "oligonucleótido sonda específico de miR" u "oligonucleótido sonda específico para un miR" se hace referencia a un oligonucleótido sonda que tiene una secuencia seleccionada para hibridar a un producto génico de miR específico, o a un transcrito inverso del producto génico de miR específico.

10 Un "perfil de expresión" o un "perfil de hibridación" de una muestra en particular es básicamente una huella del estado de la muestra; mientras que dos estados pueden tener cualquier gen en particular expresado de la misma forma, la evaluación de un número de genes simultáneamente permite la generación de un perfil génico de expresión que es único para el estado de la célula. Es decir, el tejido normal se puede distinguir del canceroso (por ejemplo, tumor), y dentro de tejido canceroso, se pueden determinar diferentes estados de pronóstico (por ejemplo, asoma las esperanzas de vida a largo plazo). Mediante la comparación de perfiles de expresión del tejido de cáncer de colon en diferentes estados, se obtiene información con respecto a qué genes son importantes (incluyendo la regulación positiva y negativa de genes) en cada uno de estos estados. La identificación de secuencias que se expresan de forma diferente en tejido de cáncer de colon, así como la expresión diferencial que da como resultado diferentes resultados de pronóstico, permite el uso de esta información en un número de formas.

25 En un ejemplo no limitante, se puede evaluar un régimen de tratamiento en particular (por ejemplo, para determinar si un fármaco quimioterapéutico actúa para mejorar el pronóstico a largo tiempo en un paciente en particular). De forma análoga, el pronóstico se puede realizar o confirmar por comparación de muestras del paciente con perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión genética (o genes individuales) permiten la identificación sistemática de fármacos candidatos que suprimen el perfil de expresión del cáncer de colon o transforman un perfil de mal pronóstico en un perfil con mejor pronóstico.

30 Por consiguiente, en el presente documento también se proporcionan métodos para diagnosticar si el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer de colon, que comprende transcribir inversamente el ARN a partir de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridar los oligodesoxinucleótidos diana a una micromatriz que comprende oligonucleótido sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control o patrón de referencia, en el que una alteración de la señal de al menos un miARN es indicativo de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer sólido.

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

45 La micromatriz se puede preparar a partir de sondas de oligonucleótidos específicos de genes generadas a partir de secuencias conocidas de miARN. La matriz puede contener dos sondas diferentes de oligonucleótidos para cada miARN, una que contiene 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 difieren de los ortólogos humanos solamente en unas pocas bases, que pueden servir como controles para condiciones rigurosas de hibridación. Los tARN u otros ARN (por ejemplo, los rARN, mARN) de ambas especies también se pueden imprimir en el microchip, proporcionando un control positivo, relativamente estable, interno para la hibridación específica. 50 También se pueden incluir uno o más controles apropiados para hibridación no específica en el microchip. Con este fin, las secuencias se seleccionan basándose en la ausencia de cualquier homología con los miARN conocidos.

55 La micromatriz se puede preparar usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos sonda de una longitud apropiada, por ejemplo, 40 nucleótidos, están modificados con 5'-amina en la posición C6 e impresos usando sistemas de micromatriz disponibles en el mercado, por ejemplo, el creador de micromatrices OmniGrid™ de GeneMachine y portaobjetos activados CodeLink™ de Amersham. El oligómero de cADN marcados correspondiente a los ARN diana se prepara por transcripción inversa del ARN diana con el cebador marcado. Después de la síntesis de la primera hebra, los híbridos de ARN/ADN se desnaturalizan para degradar los moldes de ARN. Los ADNc diana marcados preparados de este modo se hibridan a continuación al chip de micromatriz en condiciones de hibridación, por ejemplo, 6X con SSPE/formamida al 30 % a 25 °C durante 18 horas, seguido de lavado 0,75X en TNT (Tris HCl/NaCl/Tween 20) a 37 °C durante 40 minutos. En posiciones en la matriz en las que el ADN sonda inmovilizado reconoce un ADNc diana complementario en la muestra, se produce la hibridación. El ADNc diana marcado marca la posición exacta en la matriz en la que se produce la unión, permitiendo la detección y la cuantificación automática. La salida consiste en una lista de sucesos de hibridación, que indican la abundancia relativa de las secuencias específicas de cADN, y por lo tanto la abundancia relativa de los miR complementarios correspondientes, en la muestra del paciente. 65

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

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

Además de usar ensayos de nivel de expresión cuantitativa de miR específicos, un microchip que contiene oligonucleótidos sonda específicos de miARN que corresponden a una parte básica del miRNoma, preferentemente todo el miRNoma, se puede usar para realizar el perfil de expresión genética de miR, para el análisis de patrones de expresión de miR. Distintas firmas de miR se pueden asociar con marcadores de enfermedad establecidos, o directamente con un estado de enfermedad.

De acuerdo con los métodos de formación de perfiles de expresión que se describen en el presente documento, el ARN total a partir de una muestra de un sujeto del que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se transcribe cuantitativamente de forma inversa para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana marcados complementarios con el ARN en la muestra. Los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan a continuación a 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 patrón de expresión de miARN en la muestra. El perfil de hibridación comprende la señal a partir de la unión de los oligodesoxinucleótidos diana de la muestra a los oligonucleótidos sonda específicos de miARN en la micromatriz. El perfil se puede registrar como la presencia o la ausencia de unión (señal frente a señal cero).

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

Otras técnicas para medir la expresión genética de miR también están dentro de la experiencia en la materia, e incluyen diversas técnicas para medir velocidades 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 de miR, que está asociado con un pronóstico en particular en una enfermedad relacionada con el 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 de miR que está asociado con un pronóstico en particular en la muestra de ensayo, en comparación con el nivel de un producto génico correspondiente de miR en una muestra de control, es indicativo de que el sujeto tiene un cáncer sólido con un pronóstico en particular. En una realización, el producto génico de miR está asociado con un pronóstico adverso (es decir, malo). Ejemplos de un pronóstico adverso incluyen, pero no se limitan a, baja tasa de supervivencia y rápida progresión de la enfermedad. En determinadas realizaciones, el nivel de él al menos un producto génico de miR gene se mide mediante la inversión de la transcripción de ARN a partir de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana a una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos de miR en las células pueden dar como resultado la desregulación de una o más dianas pretendidas para estos miR, lo que puede conducir a la formación de cánceres sólidos. Por lo tanto, la alteración del nivel del producto génico de miR (por ejemplo, mediante la disminución del nivel de un producto génico de miR que está regulada positivamente en células de cáncer sólido, mediante el aumento del nivel de un producto génico de miR que está regulado negativamente en células de cáncer sólido) puede tratar de forma satisfactoria el cáncer sólido.

Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan adicionalmente métodos para inhibir la tumorigénesis en un sujeto que tienen, o que se sospecha que tiene, un cáncer sólido en el que al menos un producto génico de miR está desregulado (por ejemplo, regulado negativamente, regulado positivamente) en las células cancerosas del sujeto. Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado negativamente en las células

cancerosas (por ejemplo, miR-21), el método comprende la administración de una cantidad eficaz del al menos un producto génico de miR aislado, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo, de modo que se inhibe la proliferación de células cancerosas en el sujeto.

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

10 Tal como se define en el presente documento, una "variante" de un producto génico de miR se refiere a un miARN que tiene una identidad inferior a un 100 % a un producto génico de miR correspondiente de tipo silvestre y posee una o más actividades biológicas del correspondiente producto génico de miR de tipo silvestre. Ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen, pero no se limitan a, inhibir la expresión de una molécula de ARN diana (por ejemplo, inhibir la traducción de una molécula de ARN diana, modular la estabilidad de una molécula de ARN diana, inhibir el procesamiento de una molécula de ARN diana) e inhibición de un proceso celular asociado con un 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 supresión, una inserción) en un gen de miR. En determinadas realizaciones, la variante es idéntica en al menos aproximadamente un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, o un 99 % a un producto génico correspondiente de miR de tipo silvestre.

25 Tal como se define en el presente documento, un "fragmento biológicamente activo" de un producto génico de miR se refiere a un fragmento de ARN de un producto génico de miR que posee una o más actividades biológicas de un producto génico correspondiente de miR de tipo silvestre. Tal como se ha descrito anteriormente, ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen, pero no se limitan, inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana que inhibición de un proceso celular asociado con un cáncer de colon. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo es de al menos aproximadamente 5, 7, 10, 12, 15, o 17 nucleótidos de longitud. En una realización en particular, un producto génico de miR aislado se puede administrar a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos anticáncer adicionales. Tratamientos anticáncer adecuados incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia, terapia de radiación y combinaciones de las mismas (por ejemplo, quimiorradiación).

35 Cuando el al menos un producto génico de 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 al menos un producto génico de miR, mencionado en el presente documento como compuestos para la inhibición de la expresión génica de miR, de modo que se inhibe la proliferación de células de cáncer sólido. En una realización en particular, el al menos un compuesto para la inhibición de la expresión de miR es específico para un producto génico de miR seleccionado entre el grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

40 Un compuesto que inhibe la expresión genética de miR se puede administrar a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos anticáncer adicionales. Tratamientos anticáncer adecuados incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia, terapia de radiación y combinaciones de los mismos (por ejemplo, quimiorradiación).

45 Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento", tal como se usan en el presente documento, hacen referencia a la mejora de los síntomas asociados con una enfermedad o afección, por ejemplo, un cáncer sólido, que incluye la prevención o el retraso del inicio de los síntomas de la enfermedad, y/o disminuir la gravedad frecuencia de síntomas de la enfermedad o afección. Los términos "sujeto", "paciente" e "individuo" se definen en el presente documento para incluir animales, tales como mamíferos, que incluyen, pero no se limitan a, primates, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovina, ovina, equina, canina, felina, roedor, o murino. En una realización preferente, el animal es un ser humano.

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

60 Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico un aislado de miR se puede basar en el peso aproximado de una masa tumoral a tratar. El peso aproximado de una masa tumoral se puede determinar mediante el cálculo del volumen aproximado de la masa, en el que un centímetro cúbico de volumen es equivalente aproximadamente a un gramo. Una cantidad eficaz del producto génico de 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 de 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 de miR aislado también se puede basar en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto a tratar. Preferentemente, dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o por vía entérica, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz del producto génico de miR aislado que se administra 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 superior a aproximadamente 1000 microgramos/kg de peso corporal.

Un experto en la materia puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para la administración de un producto génico de miR aislado a un sujeto dado. Por ejemplo, un producto génico de miR se puede administrar al sujeto una vez (*por ejemplo*, como una sola inyección o deposición). Como alternativa, un producto génico de miR se puede administrar una o dos veces al día a un sujeto durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, más particularmente de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación en particular, un producto génico de 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 de miR administrada al sujeto puede comprender la cantidad total de producto génico administrado durante todo el régimen de dosificación.

Tal como se usa en el presente documento, un producto génico de miR "aislado" es uno que se sintetiza, o se altera o retira del estado natural a través de la intervención humana. Por ejemplo, un producto génico sintético de miR, o se considera que un producto génico de miR parcial o completamente separado del material coexistente de su estado natural, está "aislado." Un producto génico de miR aislado puede existir en forma básicamente purificada, o puede existir en una célula en la que el producto génico de miR se ha administrado. Por lo tanto, un producto génico de miR que se ha administrado deliberadamente a, o expresado en, una célula se considera un producto génico de miR "aislado". También se considera que un producto génico de miR producido dentro de una célula a partir de una molécula precursora de miR es una molécula "aislada". De acuerdo con una realización en particular, los productos génicos de miR aislados que se describen en el presente documento se pueden usar para la preparación de un medicamento para tratar un cáncer sólido en un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

Los productos génicos de miR aislados se pueden obtener usando un número de técnicas convencionales. Por ejemplo, los productos génicos de miR se pueden sintetizar químicamente o producir de forma recombinante usando métodos conocidos en la técnica. En una realización, productos génicos de miR se sintetizan químicamente usando fosforamiditas de ribonucleósido protegidas apropiadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Proveedores comerciales de moléculas de ARN sintético o reactivos para síntesis incluyen, por ejemplo, Prologo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, Estados Unidos de América), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, Estados Unidos de América), Glen Research (Sterling, VA, Estados Unidos de América), ChemGenes (Ashland, MA, Estados Unidos de América) y Cruachem (Glasgow, Reino Unido).

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

Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmido recombinante se pueden aislar a partir de sistemas de expresión de células cultivadas mediante técnicas convencionales. Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes también se pueden administrar a, y expresar directamente en, las células cancerosas. El uso de plásmidos recombinantes para administrar los productos génicos de miR a células cancerosas se analiza con más detalla a continuación.

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

La selección de plásmidos adecuados para la expresión de productos génicos de miR, métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos en el plásmido para expresar los productos génicos, y métodos de administración del plásmido recombinante a las células de interés está dentro de la experiencia en la materia. Véase, por ejemplo, Zeng y col. (2002), *Molecular Cell* 9: 1327-1333; Tuschl (2002), *Nat. Biotechnol*, 20: 446-448; Brummelkamp y col.

(2002), Science 296: 550-553; Miyagishi y col. (2002), Nat. Biotechnol. 20: 497-500; Paddison y col. (2002), Genes Dev. 16: 948-958; Lee y col. (2002), Nat. Biotechnol. 20: 500-505; y Paul y col. (2002), Nat. Biotechnol. 20: 505-508.

5 En una realización, un plásmido que expresa los productos génicos de miR comprende una secuencia que codifica un ARN precursor de miR bajo el control del promotor intermedio-temprano de CMV. Tal como se usa en el presente documento, "bajo el control" de un promotor se refiere a que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el producto génico de miR están localizadas en la posición 3' del promotor, de modo que el promotor puede iniciar la transcripción de las secuencias de codificación de producto génico de miR.

10 Los productos génicos de miR también se pueden expresar a partir de vectores virales recombinantes. Se contempla que los productos génicos de miR se pueden expresar a partir de dos vectores virales recombinantes separados, o a partir del mismo vector viral. El ARN expresado a partir de los vectores virales recombinantes se puede aislar a partir de sistemas de expresión de células cultivadas mediante técnicas convencionales, o se pueden expresar directamente en células cancerosas. El uso de vectores virales recombinantes para administrar los productos  
15 génicos de miR ha células cancerosas se analiza con más detalla a continuación.

Los vectores virales recombinantes de la invención comprenden secuencias que codifican los productos génicos de miR y cualquier promotor adecuado para la expresión de las secuencias de ARN. Promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a, las secuencias promotoras de ARN pol III U6 o HI, o los promotores de citomegalovirus. La  
20 selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia en la materia. Los vectores virales recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos de miR en una célula cancerosa.

Se puede usar cualquier vector viral capaz de aceptar las secuencias de codificación para los productos génicos de miR; por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (AV); virus adeno-asociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), Rhabdovirus, virus de leucemia de murino); virus del herpes, y similares. El tropismo de los vectores  
25 virales se puede modificar mediante el pseudotipado de los vectores con proteínas de envoltura u otros antígenos de superficie a partir de otros virus, o mediante la sustitución de diferentes proteínas de cápside viral, si fuera apropiado.

30 Por ejemplo, los vectores lentivirales de la invención se pueden pseudotipar con proteínas de superficie a partir del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola, y similares. Los vectores AAV de la invención se pueden preparar para dirigirse a diferentes células mediante ingeniería genética de los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de cápside. Por ejemplo, un vector AAV que expresa una cápside de serotipo 2 en un genoma de serotipo 2 se denomina AAV 2/2. Este gen de cápside de serotipo 2 en el vector AAV 2/2 se puede reemplazar con un gen de cápside de serotipo 5 para producir un vector AAV 2/5. Técnicas para construir vectores AAV que expresan diferentes serotipos de proteínas de cápside están dentro de la experiencia en la materia; véase, por ejemplo, Rabinowitz, J.E., y col. (2002), J. Virol. 76: 791-801.

40 La selección de vectores virales recombinantes adecuados para su uso en la invención, métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos para expresar ARN en el vector, métodos para administrar el vector viral a las células de interés, y recuperación de los productos de ARN expresado está dentro de la experiencia en la materia. 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,

45 Vectores virales particularmente adecuados son los obtenidos a partir de AV y AAV. Un vector AV adecuado para expresar los productos génicos de miR, un método construir el vector AV recombinante, y un método para administrar el vector en células diana, se describen en Xia y col. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010. Vectores AAV adecuados para expresar los productos génicos de miR, métodos para construir el vector AAV recombinante, y métodos para administrar los vectores en células diana se describen en Samulski y col. (1987), J. Virol, 61: 3096-3101; Fisher y col. (1996), J. Virol., 70: 520-532; Samulski y col. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; Patente de Estados Unidos N° 5.252.479; Patente de Estados Unidos N° 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional N° WO 93/24641. En una realización, los productos génicos de miR se expresan a partir de un solo vector AAV recombinante que comprende el promotor intermedio temprano de CMV.

50 En una determinada realización, un vector viral AAV recombinantes de la invención comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un ARN precursor de miR en conexión operativa con una secuencia de terminación de poliT bajo el control de un promotor de ARN U6 humano. Tal como se usa en el presente documento, "en conexión operativa con una secuencia de terminación de poliT" se refiere a que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las hebras sentido o antisentido son inmediatamente adyacentes a la señal de terminación de poliT en la dirección de 5'. Durante la transcripción de las secuencias de miR a partir del vector, las señales de terminación de poliT actúan para terminar la transcripción.

60 En otras realizaciones de los métodos de tratamiento de la invención, una cantidad eficaz de al menos un compuesto que inhibe la expresión de miR se puede administrar al sujeto. Tal como se usa en el presente documento, "que inhibe la expresión de miR" se refiere a que la producción de la forma madura, precursora y/o activa de producto  
65

- génico de miR después del tratamiento es menor que la cantidad producida antes del tratamiento. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si la expresión de miR se ha inhibido en una célula cancerosa, usando, por ejemplo, las técnicas para determinar el nivel de transcrito de miR que se ha analizado anteriormente para el método de pronóstico. La inhibición se puede producir en el nivel de expresión genética (es decir, mediante la inhibición de la transcripción de un gen de miR que codifica el producto génico de miR) o al nivel de procesamiento (por ejemplo, mediante la inhibición de procesamiento de un precursor de miR en un miR activo, maduro).
- Tal 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 materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un compuesto para la inhibición de la expresión de miR a administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores, tales como la talla y peso del sujeto; la extensión de la penetración 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 la expresión se puede basar en el peso aproximado de una masa tumoral a tratar, tal como se describe en el presente documento. Una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la expresión de miR también se puede basar en el peso corporal aproximado o estimado del sujeto a tratar, tal como se describe en el presente documento.
- Un experto en la materia también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para administrar un compuesto que inhibe la expresión de miR a un sujeto dado.
- Compuestos adecuados para inhibir la expresión genética de miR incluyen ARN bicatenario (tal como ARN de interferencia corto o pequeño o "siARN"), ácidos nucleicos antisentido, y moléculas de ARN enzimático, tales como ribozimas. Cada uno de estos compuestos se pueden dirigir a un producto génico dado de miR e interferir con la expresión (por ejemplo, inhibir la traducción de, inducir la escisión o destrucción de) del producto génico diana de miR.
- Por ejemplo, la expresión de un gen dado se puede inhibir mediante la inducción de interferencia de ARN del gen de miR con una molécula de ARN bicatenario aislado ("dsARN") que tiene al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de homología de secuencia con al menos una parte del producto génico de miR. En una realización en particular, la molécula de dsARN es un "ARN de interferencia corto o pequeño" o "siARN."
- siARN útil en los presentes métodos comprende ARN bicatenario corto de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El siARN comprende una hebra sentido de ARN y una hebra antisentido complementaria de ARN junto con interacciones convencionales de emparejamiento de bases de Watson-Crick (en lo sucesivo en el presente documento "bases emparejadas"). La hebra sentido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que es básicamente idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos contenida dentro del producto génico de miR diana.
- Tal como se usa en el presente documento, una secuencia de ácidos nucleicos en un siARN que es "básicamente idéntico" a una secuencia diana contenido dentro del mRNA diana es una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntico a la secuencia diana, o que difiere de la secuencia diana en uno o dos nucleótidos. Las hebras sentido y antisentido del siARN pueden comprender dos moléculas de ARN bicatenario, complementarias, o pueden comprender una sola molécula en la que dos partes complementarias son bases apaleadas y están unidas covalentemente mediante un área de "horquilla" monocatenaria.
- El siARN también puede ser ARN alterado que difiere del ARN de origen natural por la adición, supresión, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como al extremo extremos del siARN o a uno o más nucleótidos internos del siARN, o modificaciones que hacen al siARN resistente a la digestión con nucleasas, o la sustitución de uno o más nucleótidos en el siARN con desoxirribonucleótidos.
- Una o ambas hebras del siARN también pueden comprender un saliente en la posición 3'. Tal como se usa en el presente documento, un "saliente en la posición 3'" se refiere a al menos un nucleótido sin aparear que se extiende desde el extremo 3' de una hebra de ARN de doble cara. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el siARN comprende al menos un saliente en la posición 3' de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) de longitud, de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En una realización en particular, el saliente en la posición 3' está presente en ambas hebras del siARN, y tiene 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra del siARN puede comprender salientes en la posición 3' de ácido ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

El siARN se puede producir química o biológicamente, o se puede expresar a partir de un plásmido recombinante o vector viral, tal como se ha descrito anteriormente para los productos génicos aislados de miR. Métodos a modo de ejemplo para producir y someter a ensayo moléculas de dsARN o siARN se describen en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2002/0173478 de Gewirtz y en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2004/0018176 de Reich y col.

La expresión de un gen dado también se puede inhibir con un ácido nucleico antisentido. Tal como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une para dirigir ARN por medio de interacciones ARN-ARN, ARN-DNA o ARN- ácido nucleico peptídico, que altera la actividad del ARN diana. Ácidos nucleicos antisentido adecuados para su uso en los presentes métodos son ácidos nucleicos monocatenarios (*por ejemplo*, ARN, DNA, quimeras de ARN-DNA, ácido nucleico peptídico (ANP)) que generalmente comprenden una secuencia de ácidos nucleicos complementaria con una secuencia de ácidos nucleicos contiguos en un producto génico de miR. El ácido nucleico antisentido puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria en un 50-100 %, complementaria en un 75-100 %, o complementaria en un 95-100 % a una secuencia de ácidos nucleicos contiguos en un producto génico de miR.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los ácidos nucleicos antisentido activan la RNasa H u otra nucleasa celular que digiere el dúplex de producto génico de miR/ácido nucleico antisentido.

Los ácidos nucleicos antisentido también pueden contener modificaciones en la cadena principal de ácido nucleico o en los restos de azúcar y base (o sus equivalentes) para aumentar la especificidad a dianas, resistencia a nucleasas, administración u otras propiedades relacionadas con la eficacia de la molécula. Dichas modificaciones incluyen restos de colesterol, intercaladores de dúplex, tales como acridina, o uno o más grupos resistentes a nucleasas.

Los ácidos nucleicos antisentido se pueden producir química o biológicamente, o se pueden expresar a partir de un plásmido recombinante o vector viral, tal como se ha descrito anteriormente para los productos génicos aislados de miR. Métodos a modo de ejemplo para producir y someter a ensayo están dentro de la experiencia en la materia; véase, *por ejemplo*, Stein y Cheng (1993), Science 261: 1004 y Patente de Estados Unidos N° 5.849.902 de Woolf y col.

La expresión de un gen dado también se puede inhibir con un ácido nucleico enzimático. Tal como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico enzimático" se refiere a un ácido nucleico que comprende una región de unión a sustratos que tiene complementariedad con una secuencia contigua de ácidos nucleicos de un producto génico de miR, y que es capaz de escindir específicamente el producto génico de miR. La región de unión a sustrato de ácido nucleico enzimático puede ser, por ejemplo, complementaria en un 50-100 %, complementaria en un 75-100 %, o complementaria en un 95-100 % con una secuencia contigua de ácidos nucleicos en un producto génico de miR. Los ácidos nucleicos enzimáticos también pueden comprender modificaciones en los grupos de base, azúcar, y/o fosfato. Un ácido nucleico enzimático a modo de ejemplo para su uso los presentes métodos es una ribozima.

Los ácidos nucleicos enzimáticos se pueden producir química o biológicamente, o se pueden expresar a partir de un plásmido recombinante o vector viral, tal como se ha descrito anteriormente para los productos génicos aislados de miR. Métodos a modo de ejemplo para producir y someter a ensayo moléculas de dsARN o siARN se describen en Werner y Uhlenbeck (1995), Nucl. Acids Res. 23: 2092-96; Hammann y col. (1999), Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 9: 25-31; y Patente de Estados Unidos N° 4.987.071 de Cech y col.

La administración de al menos un producto génico de miR, o al menos un compuesto para inhibir la expresión de miR, inhibir la proliferación de células cancerosas en un sujeto que tiene un cáncer sólido. Tal como se usa en el presente documento, para "inhibir la proliferación de una célula cancerosa" se refiere a eliminar la célula, o de tener permanentemente o temporalmente o ralentizar el crecimiento de la célula. La inhibición de la proliferación de células cancerosas se puede deducir si el número de dichas células en el sujeto permanece constante o disminuye después de la administración del producto génico de miRs, o compuestos para la inhibición de la expresión genética de miR. Una inhibición de una proliferación de células cancerosas también se puede deducir si el número absoluto de dichas células aumenta, pero la velocidad de crecimiento tumoral disminuye.

El número de células cancerosas en el organismo de un sujeto se puede determinar por medida directa, o por estimación a partir del tamaño de las masas tumorales primarias o metastásicas. Por ejemplo, el número de células cancerosas en un sujeto se puede medir mediante métodos inmunohistológicos, citometría de flujo, u otras técnicas diseñadas para detectar marcadores de superficie característicos de células cancerosas.

El tamaño de una masa tumoral se puede determinar mediante observación visual directa, o mediante métodos de pronóstico mediante formación de imágenes, tales como rayos X, formación de imágenes por resonancia magnética, ultrasonidos, y escintigrafía. Los métodos para pronóstico mediante formación de imágenes usados para determinar el tamaño de la masa tumoral se pueden usar con o sin agentes de contraste, tal como se conoce en la técnica. El tamaño de una masa tumoral también se puede determinar por medios físicos, tales como palpación de la masa tisular o medida de la masa tisular con un instrumento de medida, tal como instrumento de calibración.

Los productos génicos de miR o compuestos para la inhibición de la expresión genética de miR se pueden

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

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

10 Los métodos de transfección de 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 ácidos nucleicos mediada por receptores, biobalística o aceleración de partículas; precipitación de fosfato cálcico, y transfección mediada por vectores virales.

15 Por ejemplo, las células se pueden transfectar con un compuesto de transferencia liposomal, por ejemplo, DOTAP (metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio, Boehringer-Mannheim) o un equivalente, tal como LIPOFECTN. La cantidad de ácido nucleico usado no es crítica para la práctica de la invención; se pueden conseguir resultados aceptables con 0,1-100 microgramos de ácido nucleico/10<sup>5</sup> células. Por ejemplo, se puede usar una relación de aproximadamente 0,5 microgramos de vector plásmido en 3 microgramos de DOTAP por 10<sup>5</sup> células.

20 Un producto génico de miR o compuesto para la inhibición de la expresión genética de miR también se puede administrar a un sujeto mediante cualquier vía adecuada de administración entérica o parenteral. Vías de administración entérica adecuadas para los presentes métodos incluyen, por ejemplo, administración oral, rectal, o intranasal. Días adecuadas de administración parenteral incluyen, por ejemplo, administración intravascular (por ejemplo, inyección de bolo intravenoso, infusión intravenosa, inyección de bolo intraarterial, infusión intraarterial e instilación con catéter en el sistema vascular); inyección peri- e intra- tisular (por ejemplo, inyección peritumoral e intratumoral, inyección intraretinal, o inyección subretinal); inyección o de posición subcutánea, que incluye 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 microgránulo 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.

35 En los presentes métodos, un producto génico de miR o producto génico de inhibición de la expresión de miR se puede administrar al sujeto en forma de ARN desnudo, en combinación con un reactivo de administración, o en forma de un ácido nucleico (*por ejemplo*, un plásmido recombinante o vector viral) que comprende secuencias que expresan el producto génico de miR o compuesto para la inhibición de la expresión del producto génico de miR. Reactivos de administración adecuados incluyen, por ejemplo, el reactivo lipófilo Transit TKO de Mirus; lipofectina; lipofectamina; celfectina; policationes (*por ejemplo*, polilisina), y liposomas,

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

45 En una realización en particular, se usan liposomas para administrar un producto génico de miR o compuesto para la inhibición de la expresión genética de miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a un sujeto. Los liposomas también pueden aumentar la vida media en sangre de los productos génicos o ácidos nucleicos. Los liposomas adecuados para su uso en la invención se pueden formar a partir de lípidos convencionales formadores de vesículas, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros o cargados negativamente y esteroides, tal como colesterol. La selección de lípidos generalmente está guiada mediante la consideración de factores, tales como el tamaño del liposoma deseado y la vida media de los liposomas en el torrente sanguíneo. Se conocen diversos métodos para preparar liposomas, por ejemplo, tal como se describe en Szoka y col. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng, 9:467; y en las Patentes de Estados Unidos N° 4.235.871, N° 4.501.728, N° 4.837.028, y N° 5.019.369.

55 Los liposomas para su uso en los presentes métodos pueden comprender una molécula de ligando que dirige el liposoma a células cancerosas. Son preferentes los ligandos que se unen a receptores prevalentes en células cancerosas, tales como anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos de células tumorales.

60 Los liposomas para su uso en los presentes métodos también se puede modificar para evitar un aclaramiento del sistema de macrófagos mononucleares ("MMS") y del sistema reticuloendotelial ("RES"). Dichos liposomas modificados tienen restos de inhibición de la opsonización en la superficie o incorporados en la estructura del liposoma. En una realización particularmente preferente, un liposoma de la invención puede comprender tanto un resto de inhibición de la opsonización como un ligando.

65

Restos para la inhibición de la opsonización para su uso en la preparación de los liposomas de la invención por lo general son polímeros hidrófilos grandes que están unidos a la membrana del liposoma. Tal como se usa en el presente documento, un resto para la inhibición de la opsonización está "unido" a una membrana del liposoma cuando está unido química o físicamente a la membrana, por ejemplo, mediante el intercalado de un ancla soluble en lípidos en la membrana por sí misma, o mediante la unión directamente a grupos activos de lípidos de membrana. Estos polímeros hidrófilos para la inhibición de la opsonización forman una capa de superficie protectora que disminuye significativamente la captación de los liposomas mediante el MMS y el RES; por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.920.016.

Restos para la inhibición de la opsonización adecuados para modificar liposomas son preferentemente polímeros solubles en agua 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 polietilenglicol (PEG) o derivados de polipropilenglicol (PPG); por ejemplo, metoxi PEG o PPG, y PEG o estearato de PPG; polímeros sintéticos, tales como poliacrilamida o poli N-vinil pirrolidona; poliamidoaminas lineales, ramificadas, o dendrímicas; ácidos poliacrílicos; polialcoholes, por ejemplo, alcohol polivinílico y polixilitol a los que están unidos químicamente grupos carboxílicos o amino, así como gangliósidos, tal como gangliósido GM1. También son adecuados copolímeros de PEG, metoxi PEG, o metoxi PPG, o derivados de los mismos. Además, el polímero para la inhibición de la opsonización de ser un copolímero de bloque de PEG y un ácido de poliamino, polisacáridos, poliamidoamina, polietilenamina, o polinucleótido. El polímero para la inhibición de la opsonización también pueden ser polisacáridos naturales que contienen aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péptico, ácido de neuramínico, ácido alginico, carragenano; polisacáridos u oligosacáridos aminados (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por ejemplo, hechos reaccionar con derivados de ácidos carbónicos con la unión resultante de grupos carboxílicos. Preferentemente, el resto para la inhibición de la opsonización es un PEG, PPG, o un derivado de los mismos. Los liposomas modificados con PEG o con derivados de PEG en algunas ocasiones se denominan "liposomas PEGilados."

El resto para la inhibición de la opsonización puede estar unido a la membrana del liposoma mediante una cualquiera de numerosas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida de PEG puede estar unido a un ancla soluble en lípidos de fosfatidil-etanolamina, y a continuación se puede unir a una membrana. De forma análoga, un polímero de dextrano se puede derivatizar con un ancla soluble en lípidos de estearilamina a través de aminación reductora usando  $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$  y una mezcla de disolventes, tal como tetrahidrofurano y agua en una relación de 30:12 a 60 °C.

Los liposomas modificados con restos para la inhibición de la opsonización permanecen en la circulación durante mucho más tiempo que los liposomas sin modificar. Por esta razón, dichos liposomas en algunas ocasiones se denominan Liposomas "sigilosos". Se sabe que los liposomas sigilosos se acumulan en tejidos alimentados por poros o microvasculatura "permeable". Por lo tanto, el tejido caracterizado por dichos defectos de microvasculatura, por ejemplo, tumores sólidos, se acumulará de forma eficaz en estos liposomas; véase Gabizon, y col. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18: 6949-53. Además, la captación reducida por el RES disminuye la toxicidad de liposomas sigilosos mediante la prevención de acumulación significativa de los liposomas en el hígado y el bazo. Por lo tanto, los liposomas que están modificados con restos para inhibición de opsonización son particularmente adecuados para administrar los productos génicos de miR o compuestos para la inhibición de la expresión genética de miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a células tumorales.

Los productos génicos mixtos o compuestos para la inhibición de la expresión genética de miR se pueden formular como composiciones farmacéuticas, denominadas en algunas ocasiones "medicamentos," antes de administrarlos a un sujeto, de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Por consiguiente, la invención incluye Composiciones farmacéuticas para tratar un cáncer sólido. En una realización, la composición farmacéutica comprende al menos un producto génico de miR aislado, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización en particular, el al menos un producto génico de miR corresponde a un producto génico de miR que tiene un nivel disminuido de expresión en células de cáncer sólido con respecto a las células de control adecuadas. En determinadas realizaciones, el producto génico de miR aislado está seleccionado entre el grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

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

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se caracterizan por ser al menos estériles y sin pirógenos. Tal como se usa en el presente documento, "composiciones farmacéuticas" incluyen formulaciones para uso humano y veterinario. Métodos para preparar composiciones farmacéuticas de la invención están dentro de la

experiencia en la materia, por ejemplo tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Science, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985)).

5 Las composiciones farmacéuticas presentes comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto para la inhibición de la expresión genética de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) (por ejemplo, de un 0,1 a un 90 % en peso), o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden adicionalmente uno o más agentes anticáncer (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos).  
10 Las formulaciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender al menos un producto génico de miR o compuesto para la inhibición de la expresión genética de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican), que están encapsulados por liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende un gen o producto génico de miR que es miR-21.

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

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

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizantes, antioxidantes, agentes para el ajuste de la osmolalidad, tampones, y agentes para el ajuste del pH. Aditivos adecuados incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente biocompatibles (por ejemplo, clorhidrato de trometamina), adiciones de agentes quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos de quelatos de calcio (tales como, por ejemplo, DTPA cálcico, 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 de la invención se pueden envasar para su uso en forma líquida, o se pueden liofilizar.

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

35 Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida administración oral puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes que se han indicado anteriormente y un 10-95 %, preferentemente un 25 %-75 %, del al menos un producto génico de miR o compuesto para la inhibición de la expresión genética de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican). Una composición farmacéutica para administración con aerosol (para inhalación) puede comprender un 0,01-20 % en peso, preferentemente un 1 %-10 % en peso, del al menos un producto génico de miR o compuesto para la inhibición de la expresión genética de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) encapsulado en un liposoma tal como se ha descrito anteriormente, y un agente propulsor. Si se desea, también se puede incluir un vehículo; por ejemplo, lecitina para administración intranasal.

40 Las composiciones farmacéuticas de la invención puede comprender adicionalmente uno o más agentes anticáncer. En una realización en particular, las composiciones comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto para la inhibición de la expresión genética de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) y al menos un agente quimioterapéutico. Agentes quimioterapéuticos que son adecuados para los métodos de la invención incluyen, pero no se limitarán, agentes de alquilación del ADN, agentes antibióticos antitumorales, agentes antimetabólicos, agentes estabilizantes de la tubulina, agentes desestabilizantes de la tubulina, agentes antagonistas de hormonas, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de proteína quinasa, inhibidores de HMG-CoA, inhibidores de CDK, inhibidores de ciclinas, inhibidores de caspasas, inhibidores de matalioproteinasas, ácidos nucleicos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ácidos nucleicos, y agentes virales, bacterianos y exotóxicos modificados por vía molecular. Ejemplos de agentes adecuados para las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, arabinósido de citidina, metotrexato, vincristina, etopósido (VP-16), doxorubicina (adriamicina), cisplatino (CDDP), dexametasona, arglabina, ciclofosfamida, sarcolisina, metilnitrosourea, fluarouracilo, 5-fluorouracilo (5FU), vinblastina, camptotecina, actinomicina D, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, oxaliplatino, irinotecán, topotecán, leucovorina, carmustina, estreptozocina, CPT-11, taxol, tamoxifeno, dacarbazina, rituximab, daunorubicina, 1-β-D-arabinofuranosilcitosina, imatinib, fludarabina, docetaxel, FOLFOX4.

65 Además, en el presente documento también se proporcionan métodos para identificar un inhibidor de la tumorigénesis, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un

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

Agentes adecuados incluyen, pero no se limitan a fármacos (por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos), y macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos). El agente se puede producir de forma recombinante, sintéticamente, o se puede aislar (es decir, purificar) a partir de una fuente natural. Diversos métodos para proporcionar dichos agentes a una célula (por ejemplo, transfección) son bien conocidos en la técnica, y varios de dichos métodos se han descrito anteriormente en el presente documento. Además, métodos para detectar la expresión de al menos un producto génico de miR (por ejemplo, transferencia de Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR, formación de perfiles de expresión) son bien conocidos en la técnica. Varios de estos métodos también se han descrito anteriormente en el presente documento.

La invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1

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

Nosotros comparamos perfiles de microARN de 84 pares de tumores de colon y tejidos no tumorales adyacentes usando micromatrices de microARN<sup>30</sup>. Estos 84 sujetos eran pacientes reclutados en gran Baltimore, área de Maryland, con incidencia de adenocarcinoma de colon y se mencionan como la cohorte del ensayo de Maryland (Tabla 1).

**Tabla 1** - Características de Población y Tumores

	Cohorte del Ensayo de Maryland	Cohorte de Validación de Hong Kong
	N=84	N=113
Área de reclutamiento	Baltimore, Maryland, Estados Unidos de América	Hong Kong, China
Edad en el momento de la inscripción - años Media ± DS	64,6 ± 10,7	55,8 ± 15
Intervalo	32-87	32-84
Sexo-nº, (%)		
Masculino	66 (79)	56 (50)
Femenino	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 (30)
Proximal	34 (41)	2 (20)
Histología de Adenocarcinoma - nº. (%) Adenocarcinoma	75 (89)	105 (93)

Adenocarcinoma mucinoso,	8 (10)	7 (6)
Carcinoma adenoescamoso	1 (1)	0 (0)
Célula en anillo de sello y mucinosa	0 (0)	1 (1)
Quimioterapia Adyuvante <sup>2</sup> - n°. (%) Recibida	22 (37)	4 (35)
No recibida	37 (63)	73 (65)
Estadio de TNM – n°. (%)		
II	29 (34)	37 (33)
III	36 (43)	48 (42)
IV	10 (12)	19 (17)

<sup>1</sup>Distal incluye tumores localizados en o distales al colon descendente. Tumores proximales incluyen tumores en o Proximales al ángulo esplénico. La localización del tumor estaba disponible para 82 sujetos en la cohorte original y todos los sujetos en la cohorte de validación. <sup>2</sup>La información detallada referente a la recepción de quimioterapia estaba disponible para 59 sujetos en la cohorte del ensayo y todos los sujetos en la cohorte de validación. La quimioterapia estaba basada principalmente en fluorouracilo (en las formas de 5-fluorouracilo intravenoso o fármacos orales que incluyen tegafur con uracilo [UFT]) con o sin Levamisol o Leucovorina.

Los perfiles de microARN tumoral eran claramente diferentes a los perfiles no tumorales. Se encontraron treinta y siete microARN independientes a expresar diferencialmente en tumores ( $p < 0,001$  con tasa de descubrimientos falsos  $< 0,5\%$ ; **Tabla 2**).

5

**Tabla 2** - MicroARN que se Expresan Diferencialmente en Tumores

Sonda	miR maduro	valor de p <sup>1</sup>	FDR <sup>2</sup>	Número de Veces de Cambio	Localización Cromosómica
hsa-mir-21Nol	miR-21	$< 1e-07$	$< 1e-07$	1,7	17q23.2
hsa-mir-021-prec-17Nol	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	9,05E-05	1,2	Xp11.3
hsa-mir-181b-2No1	miR-181b	1,90E-06	8,74E-05	1,2	9q33.3
hsa-mir-210-prec	miR-210	1,12E-05	0,00032	1,2	11p15.5
hsa-mir-020-prec	miR-20a	2,53E-05	0,00057	1,5	13q31.3
hsa-mir-106-prec-X	miR-106a	3,30E-05	0,00058	1,4	X26.2
hsa-mir-106aNol	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
nsa-mir-335No2	miR-335	3,55E-05	0,00058	1,2	7q32.2.
hsa-mir-222-precNol	miR-222	4,27E-05	0,00065	1,2	Xp11,3
hsa-mir-338Nol	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-346Nol	miR-346	8,42E-05	0,00084	1,2	10q23,2
hsa-mir-106bNol	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-INo2	miR-219	0,0002515	0,00199	1,3	9q34.11
hsa-mir-34aNol	miR-34a	0,000265	0,00203	1,1	lp36.22
hsa-mir-099b-prec-19NO1	1miR-99b	0,0003758	0,00259	1,1	19q13.41

hsa-mir-185-precNo2	miR-185	0,0003827	0,00259	1,2	22q11.21
hsa-mir-223-prec	miR-223	0,0004038	0,00265	1,4	Xq12
hsa-mir-211-precNo2	miR-211	0,0004338	0,00277	1,1	15q13.3
hsa-mir-135-1-prec	miR-135a	0,0004648	0,00287	1,1	3p21.1
hsa-mir-127-prec	miR-127	0,0004748	0,00287	1,1	14q32.31
hsa-mir-203-precNo1	miR-203	0,0004993	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

## MicroARN con Expresión reducida en Tumores

Sonda	miR maduro	valor de p <sup>1</sup>	FDR <sup>2</sup>	Número de Veces 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	8,74E-06	0,00029	0,7	11q13.1
hsa-mir-1-2No2	miR-1	2,22E-05	0,00057	0,9	18 g11.2
hsa-mir-34bNo2	miR-34b	4,78E-05	0,00069	0,8	11q23.1
hsa-mir-215-precNo1	miR-215	5,26E-05	0,00071	0,7	1q41
hsa-mir-192No1	miR-192	7,36E-05	0,00081	0,7	11q13.1
hsa-mir-301 No2	miR-301	7,44E-05	0,00081	0,7	17q23.2
hsa-miR-324-SpNo2	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

<sup>1</sup>Los valores de p indicados son el resultado del análisis de comparación de clases emparejadas de patrones de expresión de microARN a partir de 84 pares de adenocarcinomas de colon y tejido no tumoral. <sup>2</sup>FDR = Tasa de Descubrimientos Falsos

5 Veintiséis microARN se expresaron a niveles más altos en tumores con miR-21 enriquecido lo máximo a 1,8 veces. Los perfiles de microARN global distinguen entre tumor y tejido no tumoral emparejado con un 89 % de precisión usando los vecinos 3 veces más cercanos o los algoritmos de predicción más cercanos de clase centroide (validación cruzada 10 veces repetida 100 veces), lo que sugiere un cambio sistemático en los patrones de expresión de microARN durante la formación del tumor.

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

15

MiR-20a (2,3 veces), miR-21 (2,8 veces), miR106a (2,4 veces), miR-18 lb (1,4 veces) y miR-203 (1,8 veces) todo se expresaron a niveles más altos en tumores ( $p < 0,001$ , ensayo de Wilcoxon de pares igualados) (**Tabla 3a**).

**Tabla 3** - Expresión de microARN en Tumores frente a Tejido No tumoral Emparejado

5

**Tabla 3a** - La Cohorte de Validación de Hong Kong

			Número de Veces de Cambio	
microARN	$\Delta\Delta Ct^1$	DE( $\Delta\Delta Ct$ )	tumores <sup>2</sup>	Valor - $p^3$
miR-20a	1,18	0,97	2,3 veces	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
miR-21	1,47	1,20	2,8 veces	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
miR-106a	1,25	0,94	2,4 veces	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
miR-181 b	0,47	1,03	1,4 veces	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
miR-203	0,83	1,40	1,8 veces	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>

**Tabla 3b** Expresión de microARN en Adenoma frente a Tejido de No adenoma Emparejado

	Promedio		Número de Veces de Cambio	
microR	$\Delta\Delta Ct^1$	DE( $\Delta\Delta Ct$ )	adenomas <sup>2</sup>	valor de $p^3$
miR-20a	-0,11	0,97	0,9 veces	$p = 0,82$
miR-21	0,64	0,90	1,6 veces	<b><math>p = 0,006</math></b>
miR-106a	0,28	1,22	1,2 veces	$p = 0,19$
miR-181b	0,30	1,24	1,2 veces	$p = 0,27$
miR-203	0,77	1,98	1,7 veces	$p = 0,14$

<sup>1</sup>Average ( $\Delta Ct$  de tumor -  $\Delta Ct$  de no tumor emparejado) o Promedio ( $\Delta Ct$  de adenoma-  $\Delta Ct$  de no adenoma emparejado) a partir de qRT-PCR. <sup>2</sup>Calculado mediante  $2^{\Delta\Delta}$ . <sup>3</sup>Ensayo de Wilcoxon de pares igualados. DE = desviación estándar. 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 tejido para miR-21, miR-106a, y miR-181b. Para todas las comparaciones de adenoma/no adenoma, se usaron 18 pares de tejido.

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

15 Nosotros usamos hibridación *in situ* para visualizar la expresión de miR-21 en tejido tumoral y no tumoral adyacente (véanse las **Figuras la-f**).

20 MiR-21 se expresa a altos niveles tanto los núcleos como el citoplasma de células epiteliales de colon en tejido tumoral humano en comparación con tejido no tumoral adyacente. Estos resultados son consistentes con los datos de qRT-PCR y de micromatriz y suponen un papel de apoyo para los microARN en carcinogénesis.

**MiR-21 se expresa a niveles más altos en adenomas de colon**

25 Los adenomas representan un estadio precursor en los adenocarcinomas de colon<sup>3</sup>. Nosotros sometimos a ensayo niveles de expresión de miR-20a, miR21, miR-106a, miR-181b y miR-203 mediante qRT-PCR en 18 pares de tejido de adenoma y de no adenoma adyacente. Aunque cuatro de cinco microARN mostraron niveles aumentados en el tejido de adenoma, solamente miR-21 fue significativo enriquecido en 1,6 veces superior ( $p = 0,006$ , ensayo de Wilcoxon de pares igualados) (véase la **Tabla 3b**).

30 En tejido de adenoma expresó niveles más elevados de miR-21 en 15/18 pares emparejados. Estadios más avanzados de tumores expresan niveles más elevados de miR-21. Los sujetos se estratificaron basándose en el pronóstico de estadificación de adenoma y TNM, en los que el adenoma se consideró al menos avanzado y el

Estadio IV de TNM fue el más avanzado. Los adenomas expresaron niveles más bajos de expresión de miR-21 que los tumores a partir de la cohorte de validación ( $p < 0,001$ , ensayo de Mann-Whitney). Los tumores más avanzados expresaron niveles más elevados de expresión de miRs-21 (ensayo de tendencia,  $p < 0,001$ ) (véase la Figura 1g).

5 Esta tendencia también se observó usando datos de micromatriz de microARN a partir de la cohorte del ensayo de Maryland ( $p = 0,04$ ) (véase la Figura 2).

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

10 Nosotros analizamos relaciones de expresión individual tumor/no tumor de microARN (T/N) para determinar si cualquiera estaba asociada con un mal pronóstico. Las relaciones de expresión de microARN de TIN se clasificaron elevadas basándose en el tercil más elevado. Nosotros buscamos cualquier microARN en el que las relaciones elevadas de TIN estaban asociadas con la supervivencia al cáncer ( $p < 0,05$ ). A partir de éstos, nosotros seleccionamos microARN que se expresaban diferencialmente en tumores ( $p < 0,001$ ). Cinco microARN satisfacían estos criterios. El análisis de Kaplan-Meier indicó que cada uno de las relaciones elevadas de 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 ( $p = 0,004$ ) estaban asociadas entre sí con una escasa supervivencia. Estos cinco microARN se seleccionaron para análisis adicional.

20 Adenocarcinomas de colon de un 89-93 % de los sujetos de este estudio tenían una histología típica. Una minoría de los tumores eran de histologías de adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso, o carcinoma de células en anillo de sello (véase la Tabla 1). Diferentes subtipos de adenocarcinomas pueden estar asociados con diferentes resultados clínicos, incluyendo el pronóstico de supervivencia<sup>31</sup>. Para eliminar los factores de confusión potencial asociados con la histología, nosotros excluimos todos los sujetos con adenocarcinomas mucinosos, carcinomas adenoescamosos y carcinomas de células en anillo grabado del análisis inicial.

25 Las asociaciones de relaciones de T/N con escasa supervivencia se podrían de ver a niveles de expresión de microARN en el tejido tumoral, el tejido no tumoral adyacente, o una combinación de ambos. Para distinguir estas posibilidades, nosotros analizamos por separado la asociación de la expresión de microARN en tumores y no tumores emparejados. Cada uno de los niveles de expresión elevada en tumores (basándose en el tercil más elevado) para miR-20a, miR-21, miR106a, miR-181b y miR-203 se asociaron con una escasa supervivencia en la cohorte del ensayo de Maryland (véase la Figura 3a, también a partir de datos que no se muestran). No se observó asociación significativa con la expresión de microARN en tejido no tumoral para cualquiera de los cinco microARN.

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

**Tabla 4** - Análisis de Regresión Univariado y Multivariado de Cox de los Niveles de Expresión de miR-21 y Supervivencia Global al Cáncer en Sujetos con Adenocarcinoma de Colon<sup>1</sup>

Tabla 4a	Cohorte del Ensayo de Maryland			
	Análisis univariado		Análisis multivariado <sup>2</sup>	
Característica	HR (CI al 95 %)	valor de $p$	HR (CI al 95 %)	valor de $p$
Expresión de miR-21 <sup>3</sup> N = 71				
Baja	1,0		1,0	
Elevada	<b>2,5 (1,2-5,2)</b>	<b>0,01</b>	<b>2,9 (1,4-6,1)</b>	<b>0,004</b>
Estadio de TNM				
I-II	1,0		1,0	
III-IV	<b>3,5 (1,6-7,9)</b>	<b>0,002</b>	<b>3,4 (1,5-7,8)</b>	<b>0,004</b>
Edad en el momento de la inscripción < 50	1,0			
≥ 50	0,7 (0,2-2,3)	0,52		
Sexo				
Femenino	1,0			
Masculino	1,4 (0,5-3,9)	0,57		
Raza				
Blanca	1,0			
Negra	1,0 (0,5-2,1)	0,97		

Localización del Tumor Distal	1,0			
Proximal	0,6 (0,3-1,4)	0,26		
<b>Tabla 4b</b>	Cohorte de Validación de Hong Kong			
	Análisis univariado		Análisis multivariado <sup>2</sup>	
Característica	HR (CI al 95 %)	valor de p	HR (CI al 95 %)	valor de p
Expresión de miR-21 <sup>3</sup> n = 103				
Baja	1,0		1,0	
Elevada	<b>2,4 (1,4-3,9)</b>	<b>0,002</b>	<b>2,4 (1,4-4,1)</b>	<b>0,002</b>
Estadio de TNM I-II	1,0		1,0	
III-IV	<b>4,7 (2,4-9,5)</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>4,7 (2,4-9,5)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Edad en el momento de la inscripción < 50	1,0			
≥ 50	1,5 (0,9-2,6)	0,14		
Sexo Femenino	1,0			
Masculino	1,4 (0,8-2,3)	0,29		
Localización 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 qRT-PCR con la cohorte de Hong Kong. <sup>1</sup> Los casos con adenocarcinoma mucinoso, Carcinoma adenoescamoso o Carcinomas de células en anillo de sello se excluyeron de este análisis. <sup>2</sup> El análisis multivariado usó adición gradual y se encontró que la eliminación de covariables clínicas estaba asociada con la supervivencia en modelos univariados (p < 0,10) y los modelos finales incluyen solamente esas covariables que estaban asociadas significativamente con la supervivencia (estadística de Wald p < 0,05). <sup>3</sup> La expresión elevada en tumores para todos los miARN se definió basándose en el tercil más elevado.				

Los individuos con tumores que expresan niveles elevados de miR-21 presentaban un riesgo significativamente más elevado de fallecer por cáncer de colon en los análisis tanto univariado (HR = 2,5 [1,2-5,2], p = 0,01) como Multivariado (HR = 2,9 [1,4-6,1], p = 0,004).

5

Para validar estos hallazgos, nosotros usamos qRT-PCR para medir los niveles expresión tumoral y no tumoral para estos cinco microARN en la cohorte de validación de Hong Kong y analizamos las asociaciones con pronóstico. La expresión tumoral de miR-21 elevada predice un mal pronóstico en la cohorte de validación de Hong Kong (p = 0,001, ensayo de rango logarítmico de Kaplan-Meier) mientras que la expresión en tejido no tumoral no lo hace (véase la Figura 3b).

10

No encontramos asociaciones estadísticamente significativas con el la expresión de miR-20a, miR-106a, 181b o miR-203 en esta cohorte.

15

La expresión de miR-21 elevada en tumores no estaba significativamente asociada con la edad, género, histología del tumor, o localización del tumor (ensayo exacto de Fisher) en la cohorte de validación de Hong Kong. Todas las covariables se examinaron mediante análisis de riesgos proporcionales de Cox (**Tabla 4b**).

20

La expresión de miR-21 elevada en tumores (HR = 2,4 [1,4-3,9], p = 0,002) y estadificación de TNM (HR = 4,7 [2,4-9,5], p < 0,001) se asociaron significativamente con la supervivencia en modelos univariados. El análisis de regresión de Cox multivariado demostró que la expresión de miR-21 elevada en tumores predice un mal pronóstico de supervivencia (HR = 2,4 [1,4-4,1], p = 0,002) independiente de otras covariables clínicas, coherente con nuestros hallazgos en la cohorte de ensayo de Maryland.

25

Repetimos el análisis incluyendo todos los sujetos independientemente de la histología tumoral. En ambas poblaciones base, la asociación con la expresión de miR-21 elevada y el pronóstico permanecieron (Véase la Figura

4, Véase la **Tabla 5**).

**Tabla 5** - Análisis de Regresión de Cox Univariado y Multivariado de Niveles de Expresión de miR-21 y Supervivencia Global al Cáncer en Sujetos con Todos los Sujetos

5

<b>Tabla 5a</b>	Cohorte del Ensayo de Maryland			
	Análisis univariado		Análisis multivariado	
Característica	HR (CI al 95 %)	valor de p	HR (CI al 95 %)	valor de p
Expresión de miR-21 N = 79				
Baja	1,0		1,0	
Elevada	<b>2,0 (1,1-4,0)</b>	<b>0,04</b>	<b>2,1 (1,1-4,0)</b>	<b>0,03</b>
Estadio de TNM I-II	1,0		1,0	
III-IV	<b>3,2 (1,5-6,9)</b>	<b>0,002</b>	<b>3,2 (1,5-6,8)</b>	<b>0,003</b>
Edad en el momento de la inscripción < 50	1,0			
≥ 50	0,7 (0,2-2,4)	0,59		
Sexo Femenino	1,0			
Masculino	1,6 (0,7-4,2)	0,33		
Raza Blanca	1,0			
Negra	1,0 (0,5-2,0)	0,99		
Localización del Tumor Distal	1,0			
Proximal	0,8 (0,3-2,1)	0,65		
Histología de Adenocarcinoma	1,0			
Mucinoso o Adenoescamoso	0,7 (0,3-2,1)	0,57		
<b>Tabla 5b</b>	Cohorte de Validación de Hong Kong			
	Análisis univariado		Análisis multivariado <sup>2</sup>	
Característica	HR (CI al 95 %)	valor de p	HR (CI al 95 %)	valor de p
Expresión de miR-21 <sup>3</sup> n = 111				
Baja	1,0		1,0	
Elevada	<b>2,3 (1,4-3,9)</b>	<b>0,002</b>	<b>2,3 (1,4-3,9)</b>	<b>0,002</b>
Estadio de TNM I-II	1,0		1,0	
III-IV	<b>4,9 (2,5-97)</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>4,9 (2,5-98)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Edad en el momento de la inscripción < 50	1,0			
≥ 50	1,4 (0,8-2,4)	0,20		
Sexo Femenino	1,0			
Masculino	1,3 (0,8-2,3)	0,27		
Localización del Tumor Distal	1,0			

Proximal	0,7 (0,3 -1,4)	0,27		
Histología de Adenocarcinoma	1,0			
Mucinoso o Adenoescamoso	1,2 (0,4-3,3)	0,74		

La expresión de microARN se midió con micromatrices de miARN para la cohorte de Maryland y con qRT-PCR con las poblaciones base de Hong Kong. <sup>1</sup>Todos los individuos incluyeron en este análisis independientemente de la histología tumoral. El análisis multivariado usó adición gradual y se encontró que la eliminación de covariables clínicas estaba asociada con la supervivencia en modelos univariados ( $p < 0,10$ ) y los modelos finales incluyen solamente esas covariables que estaban asociadas significativamente con la supervivencia (estadística de Wald  $p < 0,05$ ). <sup>3</sup>La expresión elevada en tumores para todos los miARN se definió basándose en el tercil más elevado.

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

5 Los biomarcadores de identificación asociados con una respuesta a la quimioterapia adyuvante permitirá a los médicos predecir mejor los beneficios de la terapia. Con este fin, se analizaron asociaciones con la expresión de miR-21 y la respuesta a quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer en estadio II y III. La información sobre la administración de la quimioterapia adyuvante estuvo disponible para 47 de 65 sujetos en estadio II o III en la cohorte del ensayo de Maryland y para todos los sujetos en la cohorte de validación de Hong Kong.

10 En ambas poblaciones base, los regímenes de quimioterapia estaban basados principalmente en fluorouracilo (en las formas de 5-fluorouracilo intravenoso o fármacos orales que incluyen tegafur con uracilo [UFT]) con o sin Levamisol o Leucovorina. Solamente los sujetos con histología de adenocarcinoma típico se usaron para este análisis, dejando 20 de 42 individuos en estadio II/III recibieron quimioterapia en la cohorte de Maryland. Para los que recibieron quimioterapia, la expresión de miR-21 elevada en tumores predijo peor supervivencia global ( $p = 0,01$ , ensayo de rango logarítmico de Kaplan-Meier) dando soporte preliminar de que miR-21 elevado está asociado con una mala respuesta a la quimioterapia adyuvante.

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

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

30 El análisis de regresión de Cox multivariado se usó para analizar estas observaciones para mostrar que la expresión de miR-2 elevada que predecía un mal pronóstico ( $HR = 3,1 [1,5-6,1]$ ;  $p = 0,001$ ) y que la recepción de quimioterapia era predictiva de mejores resultados de supervivencia ( $HR = 0,3 [0,1-0,5]$ ;  $p < 0,001$ ) independientemente de otras covariables clínicas (Tabla 6a).

35 **Tabla 6** - Análisis de Regresión de Cox Univariado y Multivariado de Expresión de miR-21, Recepción de Quimioterapia Adyuvante y Supervivencia al Cáncer en Sujetos con Adenocarcinoma en Estadio I/III<sup>1</sup>

Tabla 6a	Cohorte del Ensayo de Maryland			
	Análisis univariado		Análisis multivariado <sup>2</sup>	
Característica	HR (CI al 95 %)	valor de p	HR (CI al 95 %)	valor de p
Expresión de miR-21 <sup>3</sup> N = 77				
Baja	1,0		1,0	
Elevada	<b>2,6 (1,3-5,1)</b>	<b>0,005</b>	<b>3,1 (1:5-6,1)</b>	<b>0,001</b>
No recibieron Quimioterapia Adyuvante	1,0		1,0	
Recibieron	<b>04, (0,2-0,8)</b>	<b>0,01</b>	<b>0,3 (0,1-0,5)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Estadio de TNM II	1,0		1,0	

III	<b>2,8 (1,3-6,0)</b>	<b>0,008</b>	<b>5,4 (2,4-12)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Localización del Tumor Distal	1,0		1,0	
Proximal	<b>0,3 (0,1-1,0)</b>	<b>0,04</b>	<b>0,2 (0,1-0,8)</b>	<b>0,02</b>
Edad en el momento de la inscripción < 50	1,0			
≥ 50	1,6 (0,8-3,1)	0,20		
Sexo Femenino	1,0			
Masculino	1,2 (0,6-2,3)	0,61		
<b>Tabla 6b</b>	Cohorte de Validación de Hong Kong			
	Análisis univariado		Análisis multivariado <sup>2</sup>	
Característica	HR (CI al 95 %)	valor de p	HR (CI al 95 %)	valor de p
Expresión de miR-21 <sup>3</sup> N = 119				
Baja	1,0		1,0	
Elevada	<b>2,6 (1,5-4,5)</b>	<b>0,001</b>	<b>3,0 (1,7-5,4)</b>	<b>&lt;0,001</b>
No recibieron Quimioterapia Adyuvante	1,0		1,0	
Recibieron	<b>07, (0,4-1,2)</b>	<b>0,21</b>	<b>0,4 (0,2-0,8)</b>	<b>0,004</b>
Estadio de TNM	1,0		1,0	
III	<b>3,2 (1,7-6,1)</b>	<b>0,001</b>	<b>5,2 (2,6-11)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Localización del Tumor Distal	1,0		1,0	
Proximal	<b>0,4 (0,2-0,8)</b>	<b>0,02</b>	<b>0,3 (0,1-0,7)</b>	<b>0,007</b>
Edad en el momento de la inscripción < 50	1,0			
≥ 50	1,4 (0,7-2,5)	0,32		
Sexo Femenino	1,0			
Masculino	1,3 (0,7-2,2)	0,44		
La expresión de los miARN se midió con qRT-PCR. <sup>1</sup> Los sujetos en estadio II/III de TNM con histología de adenocarcinoma típico se incluyeron en este análisis. <sup>2</sup> El análisis multivariado usó adición gradual y se encontró que la eliminación de covariables clínicas estaba asociada con la supervivencia en modelos univariados (p < 0,10) y los modelos finales incluyen solamente esas covariables que estaban asociadas significativamente con la supervivencia (estadística de Wald p < 0,05). <sup>3</sup> La expresión elevada en tumores para todos los miARN se definió basándose en el tercil más elevado. La razón estaba asociada con un mal pronóstico.				

Los análisis que usan recaída de cáncer como un punto final en lugar de muerte por cáncer dieron como resultado asociaciones similares con la expresión de miR-21 elevada en tumores que predicen una recidiva de la enfermedad más rápida (no se muestran los datos).

5 Un análisis que combina ambas poblaciones base dio como resultado asociaciones similares. El análisis de Kaplan-Meier demostró que la expresión de miR-21 elevada predecía un mal pronóstico en los sujetos en el estadio II (p = 0,02) o en el estadio III (p = 0,004) (véase la Figura 6).

10 La expresión de miR-21 elevada predijo una mala respuesta a la quimioterapia en sujetos en estadio II/III (p = 0,003) o en sujetos en el estadio III solo (p = 0,007). La regresión de Cox multivariado demostró que la expresión de miR-21 elevada predecía un mal pronóstico (HR = 3,0 [1,7-5,4]; p < 0,001) y el tratamiento con quimioterapia adyuvante predecía mejor supervivencia (HR = 0,4 [0,2-0,8]; p = 0,004) independiente de otras covariables clínicas (Tabla 6b).

**Discusión**

15

Nosotros analizamos perfiles de microARN en tejidos de cáncer de colon usando dos poblaciones base independientes. Treinta y siete microARN se expresaron diferencialmente en tejidos tumorales mediante un análisis de micromatriz de microARN. Los patrones de expresión de todos los cinco microARN sometidos a ensayo se validaron en la cohorte de Hong Kong. El poder discriminatorio de cinco microARN para diferenciar entre tejido tumoral y no tumoral indica que los cambios predecibles y sistemáticos de los patrones de expresión de microARN se producen durante tumorigénesis y probablemente son representativos de la mayoría de los adenocarcinomas de colon esporádico.

Se encontró que todos los miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b y miR-203 se expresaban a niveles más altos en los tumores de colon. Estos cambios en los patrones de expresión de microARN pueden estar asociados simplemente con el cáncer de colon o ser causales con la progresión histológica del cáncer. Existe una gran evidencia que sugiere que los cambios en los patrones de expresión de microARN promueven la formación de tumores, especialmente para miR-20a and miR-21, MiR-20a es parte del grupo de microARN policistrónico de miR-17-92<sup>32</sup>.

La sobreexpresión de este grupo potencia la proliferación celular *in vitro*<sup>33</sup> y acelerar la formación de tumores en modelos animales<sup>16</sup>. La expresión forzada del grupo miR-17-92 provoca un mayor tamaño del tumor y vascularización de tumor en ratones regulando de forma negativa la proteína Tsp1 antiangiogénica<sup>24</sup>. La evidencia experimental también sugiere que la mayor expresión de miR-21 promueve el desarrollo tumoral. MiR-21 se expresa en niveles elevados en la mayoría de los tumores sólidos<sup>19, 34</sup>. La sobreexpresión de miR-21 actúa como un factor antiapoptótico en células de glioblastoma humano<sup>3</sup>. La inhibición de miR-21 inhibe el crecimiento celular *in vitro* e inhibe el crecimiento tumoral en modelos de ratón de xenoinjerto a través de una regulación negativa indirecta del factor antiapoptótico Bcl-2<sup>35</sup>. Estudios en líneas celulares humanas han mostrado que miR-21 también puede dirigir los genes supresores de tumores PTEN<sup>36</sup> y TP53<sup>37</sup>. Todos estos datos tomados en conjunto apoyan un papel causal para la expresión de microARN alterado durante la tumorigénesis.

Los adenomas representan un estadio precursor de adenocarcinoma. Los adenomas expresan altos niveles de miR-21. Si la expresión aumentada de miR-21 promueve la progresión del tumor de colon, la expresión aumentada en adenomas puede ser un suceso celular temprano en la progresión del cáncer. La inhibición de la actividad de miR-21 puede ayudar a prevenir la promoción del tumor en poblaciones con alto riesgo que cáncer de colon, tales como individuos con poliposis adenomatosa familiar<sup>38</sup>.

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

En cada cohorte, estas asociaciones fueron independientes que todas las otras covariables clínicas que indican que la expresión de miR-21 puede ser un indicador de pronóstico útil, además de la estadificación de TNM y otros parámetros clínicos, para ayudar a identificar pacientes con alto riesgo de cáncer terminal. Estas observaciones se prepararon en dos poblaciones base independientes con composiciones raciales y geográficas diferentes. Por lo tanto, es probable que nuestras observaciones sean ampliamente aplicables a otras poblaciones.

La expresión de miR-21 elevada en tumores se asoció con una mala respuesta a la quimioterapia adyuvante en ambas poblaciones base. Estos datos pueden ayudar a predecir los beneficios de la terapia en individuos en los que se conoce su estado de expresión de miR-21. Además, si la expresión de miR-21 elevada es causal para la escasa supervivencia en pacientes con cáncer de colon, antagónimos<sup>29,39</sup> otros agentes terapéuticos antisentido que se dirigen a miR-21 pueden tener beneficios terapéuticos en sujetos con tumores que expresan miR-21 elevado. Esto se puede usar además de las terapias actuales para mejorar los resultados de supervivencia.

En el presente documento, los inventores han encontrado diferencias sistemáticas en los patrones de expresión de microARN entre tumores de colon y tejido no tumoral emparejado. La expresión de miR-21 elevada en tumores predice mal resultado de supervivencia y mala respuesta a la quimioterapia adyuvante en dos poblaciones base independientes, independientemente de la estadificación y de otras covariables clínicas que sugieren que puede ser un biomarcador de pronóstico útil para adenocarcinomas de colon y pronóstico de supervivencia que incluye respuesta a la terapia.

## **Métodos**

### **Recogida de tejido y aislamiento de ARN:**

Pares de tumor de colon primario y tejidos no tumorales adyacentes provenían de 84 pacientes reclutados en la Universidad del Centro Médico de Maryland entre 1993 y 2002, y de 113 pacientes reclutados en el Hospital Queen Mary de Hong Kong entre 1991 y 2000. Se han recogido antecedentes detallados de cada donante de tejido, que incluyen edad, género, estadificación clínica, localización del tumor, tiempos de supervivencia a partir del diagnóstico

y la recepción de quimioterapia adyuvante. La histopatología tumoral se clasificó de acuerdo con la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud del Sistema tumoral<sup>1</sup>. El tejido de adenoma se obtuvo a partir de la Red Cooperativa de Tejidos Humanos. Este estudio fue aprobado por el Institutional Review Board del National Institutes of Health, el Institutional Review Board de la Universidad de Hong Kong/Hospital Authority Hong Kong West Grupo y el Institutional Review Board for Human Subject Research en la Universidad de Maryland.

#### **Aislamiento de ARN y formación de perfiles de microARN:**

El ARN se extrajo de tejido usando métodos TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad) convencionales. Se realizó una formación de perfiles de micromatriz de microARN tal como se ha descrito anteriormente<sup>30</sup>. En resumen, 5 intervalos de ARN total se marcaron y hibridaron con cada micromatriz de microARN que contiene cuadruplicados de aproximadamente 400 sondas de microARN humano. Los portaobjetos se escanearon usando un escáner ScanArray LX5K de PerkinElmer, qRT-PCR de los microARN se realizó usando ensayos de MicroARN de Taqman (Applied Biosystems, Foster City) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el sistema de RT-PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems, Foster City). U6B fue el control de normalización para todos los experimentos de qRT-PCR. Todos los ensayos realizaron por duplicado (miR-20a, miR-203) o por triplicado (miR-21, miR-106a, miR-181b). qRT-PCR para miR-21, miR-106a y miR-181b se realizó por AJS, que fue cegado a los resultados de supervivencia y a los datos clínicos para miembros de la cohorte de validación en ese momento.

#### **Análisis de micromatrices:**

Los datos analizados en esta publicación se han depositado en el Gene Expression Omnibus del NCBI (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y están disponibles a través del número de acceso GSE7828 de la Serie GEO. Los datos de micromatriz normalizadas de LOESS se importaron en herramientas de materia de BRB 3.5.0 (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) y todos los análisis de micromatriz posteriores se realizaron con este software.

Se realizaron análisis de micromatriz. Las ondas compradores con valores que faltan en > 20 % de las micromatrices se retiraron de los análisis dejando 230 sondas. Los análisis de comparación de clases, emparejados picaron los microARN que se expresaban diferencialmente en tumores ( $p < 0,001$ ).

Para buscar inicialmente microARN asociados con una escasa supervivencia, las relaciones expresión de microARN tumoral/no tumoral (T/N) se analizaron en la cohorte de Maryland usando datos de micromatrices. Las relaciones de expresión de TN para los microARN se crearon por sustracción de  $\log_2$  de no tumor a partir los valores de expresión de  $\log_2$  de tumor. Los microARN que faltan en > 25 % de las relaciones de T/N se eliminaron por filtración dejando 208. Las relaciones de expresión de T/N se dividieron en dos con el tercil más elevado clasificado como elevado y los 2 terciles más bajos clasificados como bajo (véanse los Métodos Complementarios). Este punto de corte alto/bajo se usó generalmente en todo este estudio. Los niveles de expresión de microARN tumoral y no tumoral se normalizaron de forma discontinua en la fecha de los excrementos de micromatriz para todos los análisis de asociaciones con supervivencia.

#### **Hibridación *In Situ*:**

La hibridación *in situ* (ISH) se realizó con sondas para miR-21 humano, codificado, y U6 (Exiqon, Woburn) con una versión modificada del protocolo del fabricante para tejido embebido en parafina fijado con formalina (PPPE) escrito por W. Kloosterman ([http://www.exiqon.com/uploads/LNA\\_52\\_FFPE\\_miRNA\\_in\\_situ\\_protocol.pdf](http://www.exiqon.com/uploads/LNA_52_FFPE_miRNA_in_situ_protocol.pdf)) sobre tejido de colon humano. Las modificaciones incluían el uso de anticuerpo policlonal de conejo conjugado con anti-DIG/HRP y el Sistema de Amplificación de Señales con Tiramida GenPoint de DakoCytomation (DakoCytomation, Carpintería), y sustrato VECTOR® NovaRed™ (Vector Laboratories, Burlingame). Las imágenes se tomaron en un microscopio Olympus BX40 usando la cámara digital DP70 de Olympus y el software controlador de DP (Olympus, Champaign).

#### **Análisis estadístico:**

Se realizaron análisis estadísticos. Los ensayos de Wilcoxon de pares igualados se usaron para analizar diferencias en la expresión de micro-ARN entre tumores y tejido no tumoral emparejado así como las diferencias entre adenoma y tejido de no adenoma emparejado para todos los datos de qRT-PCR. Todos los ensayos de tendencia informados son ensayos no para métricos de la tendencia a través de grupos ordenados. Todos los análisis de Kaplan-Meier se realizaron con WINSTAT 2001 (R. Fitch Software). El análisis de regresión de Cox multivariado se realizó usando Intercooled Stata 9.2 (StataCorp LP, College Station). Los modelos multivariados finales se basaron en la adición gradual y se encontró que la eliminación de covariables clínicas estaba asociada con escasa supervivencia en los modelos univariados ( $p < 0,10$ ). Se usó una estadística de Wald de  $p < 0,05$  como criterio de inclusión en los modelos multivariados finales. Todos los valores de  $p$  indicados son de 2 lados. Las relaciones de riesgos se indican con intervalos de confianza de un 95 entre paréntesis. Las gráficas de expresión se prepararon usando Graphpad Prism 4.0 (Graphpad Software Inc., San Diego).

#### **Análisis adicionales de micromatrices**

Las micromatrices usadas para este análisis fueron micromatrices de microARN fijadas con aplicaciones puntuales (del Ohio State University Comprehensive Cancer Center, versión 2.0). Las intensidades de cada aplicación puntual fueron las intensidades medias del primer plano. Cada una de los 170 micromatrices usadas para este estudio contenía 11520 aplicaciones puntuales. Todas las aplicaciones puntuales en las que la intensidad del primer plano era inferior a la del fondo se reasignaron como NA (NA marca las aplicaciones puntuales de los datos perdidos). Todas las aplicaciones puntuales marcadas como deficientes por el escáner también se reasignaron como NA. Todas las aplicaciones puntuales en blanco (no oligo) con intensidad elevada del primer plano se reasignaron como NA. Cada microARN oligo se representa mediante aplicaciones puntuales por cuadruplicado en estas matrices como dos pares distantes de las dos aplicaciones puntuales adyacentes. Si había 0 o 1 NA para un cuádruplo oligo, y la media de los pares oligo distantes difería en  $> 1$  en la escala  $\log_2$ , todas las aplicaciones puntuales por cuadruplicado se reasignaron como NA. Si había 2 NA para un cuádruplo oligo y las dos intensidades de aplicación puntual de no NA diferían en  $> 1$  en la escala  $\log_2$ , todas las aplicaciones puntuales por cuadruplicado se reasignaron como NA. Si había 3 NA aplicaciones puntuales para un cuádruplo, la aplicación puntual final se reasignó como NA. En total, 1.082.689 de 1.958.400 aplicaciones puntuales se reasignaron como NA usando estos métodos. La normalización de LOESS (Suavización del Diagrama de Dispersión Localmente Ponderada) se realizó usando el paquete de software R. Todos los datos se importaron a continuación en la versión 3.5.0 de las herramientas de matrices BRB para análisis y se promediaron todas las aplicaciones puntuales duplicadas. Originalmente se usaron 85 pares (tejido tumoral y no tumoral emparejado) de matrices. Posteriormente se encontró que un caso que se identificó originalmente como un paciente con carcinoma de colon incidente se había diagnosticado como carcinoma *in situ* y se retiró del análisis dejando la población del estudio en 84 sujetos. Las listas de microARN se filtraron para incluir solamente los 389 conjuntos de sondas de hsa-miR humano. Se filtraron adicionalmente para retirar cualquier conjunto de sondas que carecía de más de un 25 % de las matrices, dejando 230 conjuntos de sondas de microARN humano. El análisis de comparación de clases emparejadas se usó para identificar los microARN que se expresaron diferencialmente entre tejido tumoral y no tumoral emparejado. Para dos microARN (miR-181b y miR-338), cada una de dos sondas independientes de medida proporcionaron resultados contradictorios con una sonda que muestran mayor expresión en tumores y una sonda que muestra menor expresión en tumores para cada microARN. Para cada una, descartamos el resultado menos significativo que designa tanto a miR-181b como miR-338 como enriquecidos en tumores. Además, qRT-PCR confirmó que miR-181b estaba enriquecido en tumores.

Inicialmente usamos perfiles de expresión de tumor/no tumor (T/N) para cada microARN para buscar los microARN que estaban asociados con escasa supervivencia. Para este análisis, decidimos dividir en dos partes todos los datos de expresión con un punto de corte alto y bajo universal para buscar asociaciones con escasa supervivencia. Para determinar qué punto de corte universal alto/bajo usar, nosotros dividimos los datos en dos partes de expresión de T/N en tres formas separadas y determinamos que método proporcionó el número más elevado de resultados significativos en la curación base del ensayo. La expresión elevada se clasificó basándose en más elevada que la media, el tercil más elevado, o el cuartil más elevado y sometimos asociaciones con estos puntos de corte con una escasa supervivencia usando análisis de regresión de Cox univariado. De los 37 microARN que se expresaban diferencialmente en tumores, la expresión elevada de cuatro se asoció con una escasa supervivencia basándose en mayor que la media, cinco basándose en el tercil más elevado, y dos basándose en el cuartil más elevado ( $p < 0,05$ , no se muestran los datos). La división en dos partes basándose en el tercil más elevado proporcionar la mayor parte de los microARN asociados con escasa supervivencia basándose en estos criterios en la cohorte de ensayo de Maryland; por lo tanto, la clasificación basándose en el tercil más elevado based se usó de forma uniforme durante todo este estudio para analizar asociaciones entre niveles de expresión de microARN y un mal pronóstico tanto en la cohorte del ensayo de Maryland como en la cohorte de validación de Hong Kong.

Nosotros usamos micromatrices de microARN para comparar los niveles expresión de miR-21 en tumores con pronóstico. La sonda de micromatriz usada para este análisis fue hsa-miR-21-precl7Nol. Este análisis necesitó normalización discontinua de los datos basándose en la fecha del experimento de micromatriz. Para normalizar con la fecha, las matrices que expresan el 1/3 más elevado de un microARN dado se clasificaron como elevado para cada día, separadamente. Hasta doce pares de tejido se describieron en cada día dado. Para cualquier día en el que se realizaron menos de 10 pares de micromatrices, las matrices realizadas en esos días se descartaron, dando como resultado la pérdida de 5 pares de matrices. Estos datos se combinaron a continuación en conjunto para el análisis de asociaciones con resultados de supervivencia. Nosotros comprobamos y no encontramos diferencias significativas en la distribución de frecuencia de edad, sexo, raza, localización del tumor, estadio de TNM, o supervivencia en el cáncer entre grupos clasificados basándose en la fecha del experimento de micromatrices (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 en la supervivencia de los pacientes. Las variables clínicas incluidas fueron edad, sexo, raza, localización del tumor, histología del tumor, recepción de terapia activantes y estadificación de TNM. Para estos modelos, nosotros elegimos dividir la edad en dos partes como edad  $> 50$  frente a edad  $< 50$  ya que la edad de identificación sistemática recomendada el cáncer de colon es la edad 50; la localización del tumor se definió como proximal si el tubo estaba localizado dentro o proximal al ángulo esplénico y distal si el tumor estaba localizado

dentro o distal al colon descendente; la estadificación de TNM se dividió basándose en enfermedad metastásica frente a no metastásica dando como resultado estadio I-II frente a III-IV. Un paciente en la cohorte de Maryland falleció el día de la cirugía dando como resultado un tiempo de supervivencia de 0 meses. Este caso se incluyó en el análisis de Kaplan-Meier y se retiró del análisis de regresión de Cox causando la diferencia de casos entre la expresión de miR-21 en tumores para la Figura 2 (n = 72) y el número de casos en el análisis de regresión de Cox de la Tabla 4 (n = 71). La regresión de Cox univariado se realizó en cada covariable clínica para examinar la influencia de cada una en la supervivencia del paciente. Los modelos multivariados finales se basaron en la adición gradual Final y se encontró que la eliminación de covariables clínicas estaba asociada con escasa supervivencia en los modelos univariados ( $p < 0,10$ ). Se usó una estadística de Wald de  $p < 0,05$  como criterio de inclusión en los modelos multivariados finales. El modelo de regresión de Cox más lento se usó para el modelo multivariado final.

**Ejemplo 2 - Resultados Iniciales**

**Los miARN se expresan diferencialmente en tumores de colon**

Nosotros analizamos los perfiles de miARN de 85 pares de tejidos de colon cancerosos y no cancerosos adyacentes usando micromatrices de miARN. Nosotros encontramos que los perfiles de expresión de miARN de los tumores eran bastante diferentes a los de los tejidos normales lo que sugiere que los miARN pueden desempeñar papeles significativos en la carcinógenesis de colon. Los análisis de comparación de clases emparejadas identificaron 27 miARN independientes que se expresaban diferencialmente en estos tumores (**Tabla 7**).

**Tabla 7** - 27 miARN se expresan diferencialmente en tumores de colon en comparación con el tejido normal, emparejado. Se encontró que 27 miARN estaban diferencialmente expresados en tumores usando análisis de comparación de clases emparejadas en herramientas de matriz 3.4 de BRB. Un valor significativo de  $p < 0,001$  se usó como el criterio para miARN expresado diferencialmente que dio como resultado una tasa de descubrimientos falsos estimada de un 0,08 %. Positiva se refiere a los miARN que se expresaban a niveles más altos en tumores mientras que negativa indica que los niveles de miARN eran menores en tumores.

Tabla 7	MicroARN	Regulación Positiva/Negativa	Valor de P
1	miR-331	Negativa	1,00E-07
2	miR-21	<b>Positiva</b>	1,00E-07
3	miR-34b	Negativa	2,00E-07
4	miR-342	Negativa	2,00E-07
5	miR-215	Negativa	2,20E-05
6	miR-3 71	Negativa	7,00E-07
7	miR-373	Negativa	6,30E-06
8	miR-192	Negativa	7,70E-06
9	miR-148b	Negativa	1,03E-05
10	miR-138	Negativa	1,49E-05
11	miR-301	Negativa	1,85E-05
12	miR-338	Negativa	2,63E-05
13	miR-153	Negativa	2,67E-05
14	miR-129	Negativa	3,20E-05
15	miR-222	<b>Positiva</b>	9,08E-05
16	miR-346	Positiva	0,000126
17	miR-204	Positiva	0,000244
18	miR-181 b	Positiva	0,000263
19	let-7a-2	Negativa	0,000272
20	miR-106a	<b>Positiva</b>	0,000305
21	miR-093	<b>Positiva</b>	0,000334

22	miR-34c	<b>Negativa</b>	0,003441
23	miR-219	Positiva	0,000352
24	miR-019b	<b>Positiva</b>	0,000364
25	miR-210	Positiva	0,000389
26	miR-185	<b>Positiva</b>	0,000516
27	miR-1	Negativa	0,00064

La tasa de descubrimientos falsos, a tener en cuenta en el ensayo de comparaciones múltiples, fue aproximadamente de un 0,8 % indicando que la mayoría, si no todos estos miARN se expresaban diferencialmente y no el resultado del ensayo de comparaciones múltiples. Se encontró que once miARN tenían niveles de expresión elevada en tumores mientras que se encontró que 16 miARN estaban reducidos en tumores. Además, los perfiles de miARN se podrían usar para predecir si o no el tejido era tumoral o no tumoral con una precisión de un 92 %. Basándose en 2000 permutaciones aleatorias, la probabilidad estas predicciones que ocurrían por casualidad aleatoria era extremadamente baja ( $p < 0,0005$ ). Estos resultados muestran que existen diferencias sistemáticas en los perfiles de expresión de miARN entre tumores y tejido normal que indican que los perfiles de expresión de miARN se convierten en alterados durante la carcinogénesis de colon.

**Los perfiles de expresión de miARN global predicen el pronóstico de supervivencia al cáncer de colon**

Nosotros determinamos si los perfiles de expresión de miARN predicen la supervivencia del paciente. Para este análisis, los dos calculamos las relaciones de expresión del miARN tumoral frente al normal (relación de TIN) para cada miARN para cada individuo. El agrupamiento jerárquico sin supervisar de todas las relaciones de TIN de miARN agruparon individuos en dos grupos marcados arbitrariamente como grupo A y grupo B (Figura 7).

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

Esto indicaba que los perfiles de miARN global son predictivos de la estadificación clínica y lo que es más importante, del pronóstico de supervivencia.

El análisis de regresión de Cox univariado y multivariado se usó para cuestionar esta relación con más detalle (**Tabla 8**).

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

Los análisis de regresión de Cox univariado (arriba) y multivariado (abajo) se realizaron para mostrar que los individuos clasificados en el grupo B de los miARN presentaban un riesgo más elevado de fallecer por cáncer de colon. Ni la edad, género o raza eran contribuciones significativas al riesgo de supervivencia. Para los fines de estos análisis, la edad se dividió en mayor que o menor que 50 y la raza se dividió en dos partes en Afro Americana (AA) y Caucásica.

Análisis Univariado		
Variable	HR (CI al 95 %)	valor de p
Grupo B/A	2,6 (1,0 - 6,3)	0,042
edad $\geq 50$ /edad < 50	0,62 (0,14 - -2,7)	0,53
masculino/femenino	1,4 (0,48 - 4,0)	0,54
AA/Caucásica	1,1 (0,83 - 2,3)	0,83
Multivariado, ajustando por edad, género y raza		
Grupo B/A	2,7 (1,1 - 6,8)	0,034
edad $\geq 50$ /edad < 50	0,49 (0,11 - -2,2)	0,35
masculino/femenino	1,5 (0,52- 4,4)	0,45
AA/Caucásica	1,0 (0,45 - 2,2)	0,99

Los individuos del grupo B iban a tener un riesgo significativamente mayor de fallecer por cáncer de colon (relación de riesgo [HR] = 2,6 ( $p = 0,04$ )). Este riesgo permaneció significativamente elevado después de ajustar la edad, etnia

y género (HR = 2,7; p = 0,03). Estos resultados demuestran el potencial del uso de perfiles de miARN de tumores de colon para predecir el pronóstico. Estos resultados sugieren que los miARN también pueden desempeñar un papel en la carcinógenesis de colon.

#### 5 **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**

10 Nosotros identificamos miARN individuales cuyos niveles de expresión eran predictivos de pronóstico de cáncer de colon. Nosotros usamos representaciones de supervivencia de Kaplan Meier y análisis de regresión de Cox multivariada en relaciones de TIN para identificar los patrones de expresión de miARN que estaban asociados con un mal pronóstico de supervivencia. Las herramientas de matriz de BRB se usaron para identificar relaciones de TIN correlacionadas con escasa supervivencia (no se muestran los datos). Nosotros elegimos analizar estos miARN con más detalle. También analizamos cualquier miARN que se expresaba diferencialmente en tumores (p < 0,01). Las relaciones de TIN para cada individuo se dividieron en dos partes basándose en las relaciones de TIN media o de cuartil más elevado. También retiramos cualquier miARN de los análisis en los que las relaciones de TIN disminuían en más de 18 individuos. Nosotros identificamos al menos 9 miARN, incluyendo miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-16h, miR-203, let-7 g, miR-29a, miR-103-2 y miR-10a cuyas relaciones de TIN son predictivos de pronóstico de cáncer de colon (Figura 8, **Tabla 9**).

#### 20 **Análisis de regresión de Cox de relaciones de TIN para miARN individuales.**

25 Los análisis de regresión de Cox univariado y multivariado se realizaron para mostrar que las relaciones de TIN de miARN individuales se podrían usar para clasificar individuos con mayor riesgo de fallecer por cáncer de colon. Las relaciones de TIN para estos 9 miARN fueron indicadores significativos de pronóstico de supervivencia independientemente de la estadificación de TNM, edad, género y raza. Nótese que las distinciones entre Elevado/Bajo para miR-16b, miR-21, miR-29a, miR-103-2, miR-106a y miR-203 se clasificaron basándose en los valores de la relación media de TIN mientras que let-7g, miR-10a y miR-1815 se clasificaron basándose en las relaciones de TIN con el cuartil más elevado.

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

Variable	HR (CI al 95 %).	p =	n
Análisis univariado			
miR-21 Elevado/Bajo	3,0 (1,3 - 7,0)	0,01	80
Análisis multivariado			
miR-21 Elevado/Bajo	2,8 (1,2 - 6,8)	0,02	
edad ≥ 50/edad < 50	0,46 (0,10 - 2,1)	0,32	
masculino/femenino	3,1(0,9-11,0)	0,07	
AA/Caucásica	1,2 (0,5 - 2,7)	0,66	
Estadio III-IV / Estadio I - II	4,4 (1,6 - 11,9)	0,004	
Análisis univariado			
miR-181b Elevado/Bajo	3,4 (1,6 - 7,5)	0,002	78
Análisis multivariado			
miR-181b Elevado/Bajo	3,3 (1,3 - 8,2)	0,01	
edad ≥ 50/edad < 50	0,39 (0,08 - 1,8)	0,23	
Masculino/femenino	2,2 (0,7 - 7,2)	0,17	
AA/Caucásica	1,1 (0,5 - 2,5)	0,82	
Estadio III-IV / Estadio I-II	3,1 (1,2 - 8,1)	0,02	
Análisis univariado			
let-7g Elevado/Bajo	2,7 (1,3 - 5,9)	0,01	84

ES 2 442 890 T3

Análisis multivariado			
let-7q Elevado/Bajo	2,5 (1,1 - 5,5)	0,03	
edad ≥ 50/edad < 50	0,5 (0,1 - 2,4)	0,39	
Masculino/femenino	1,5 (0,5 - 4,4)	0,50	
AA/Caucásica	1,3 (0,6 - 2,9)	0,50	
Estadio III-VI / Estadio I-II	3,6 (1,4 - 9,2)	0,006,	
Variable HR (CI al 95 %) p = n			
Análisis univariado			
miR-103-2 Elevado/Bajo	2,5 (1,1 - 5,6)	0,03	81
Análisis multivariado			
miR-103-2 Elevado/Bajo	3,1 (1,3 - 7,5)	0,01	
edad ≥ 50/edad < 50	0,5 (0,1 - 2,2)	0,36	
masculino/femenino	1,6 (0,6 - 4,9)	0,38	
AA/Caucásica	0,8 (0,4 - 1,9)	0,69	
Estadio III-IV / Estadio I - II	4,4 (1,7 - 11,1)	0,002	
Variable HR (CI al 95 %) p = n			
Análisis univariado			
miR-16b Elevado/Bajo	4,6 (1,7 - 12,5)	0,003	69
Análisis multivariado			
miR-16b Elevado/Bajo	5,1 (1,8 - 15,9)	0,003	
edad ≥ 50/edad < 50	0,4 (0,08 - 1,7)	0,20	
masculino/femenino	3,2 (0,8 - 1,7)	0,12	
AA/Caucásica	0,9 (1,9 - 22,4)	0,003	
Estadio III-IV / Estadio / Estadio I - II	6,5 (1,9 - 22,4)	0,003	
Variable HR (CI al 95 %) p = n			
Análisis univariado			
miR-106a Elevado/Bajo	2,6 (1,1 - 6,1)	0,01	82
Análisis multivariado			
miR-106a Elevado/Bajo	2,4 (1,0 - 5,7)	0,05	
edad ≥ 50/edad < 50	0,54 (0,11 - -2,5)	0,44	
masculino/femenino	1,8 (0,5 - 6,5)	0,34	
AA/Caucásica	1,1 (0,5 - 2,5)	0,84	
Estadio III-IV / Estadio I - II	5,4 (1,8 - 16,0)	0,002	
Variable HR (CI al 95 %) p = n			
Análisis univariado			
miR-203 Elevado/Bajo	3,8 (1,4 - 10,5)	0,01	57

Análisis multivariado			
miR-203 Elevado/Bajo	3,2 (1,1 - 9,4)	0,03	
edad ≥50/edad < 50	1,0 (0,1 - -8,1)	0,97	
masculino/femenino	1,4 (0,4 - 5,1)	0,61	
AA/Caucásica	0,9 (0,4 - 2,3)	0,83	
Estadio III-IV / Estadio I - II	3,9 (1,3 - 11,8)	0,02	
Variable			
HR (CI al 95 %)		p =	n
Análisis univariado			
miR-29a Elevado/Bajo	3,1 (1,3 - 7,3)	0,01	77
Análisis multivariado			
miR-29a Elevado/Bajo	3,2 (1,3 - 7,9)	0,01	
edad ≥50/edad < 50	0,5 (0,1 - -2,2)	0,35	
masculino/femenino	2,2 (0,6 - 7,4)	0,22	
AA/Caucásica	0,9 (0,4 - 2,1)	0,76	
Estadio III-IV / Estadio I - U	4,5 (1,7 - 12,2)	0,003	
Análisis univariado			
miR-10a Elevado/Bajo	2,7 (1,3 - 5,7)	0,01	84
Análisis multivariado			
miR-10a Elevado/Bajo	3,5 ( 1,5 - 7,8)	0,003	
edad ≥ 50/edad < 50	0,4 (0,1 - -1,9)	0,26	
masculino/femenino	1,7 (0,6 - 5,0)	0,34	
AA/Caucásica	1,0 (0,45 - 2,3)	0,98	
Estadio III-IV / Estadio I - II	4,9 (1,9 - 12,2)	0,001	

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

5 Existe una tendencia en la que los individuos con estadificación de TNM más avanzada tienen relaciones de TIN más elevadas ( $p = 0,034$ ). Las relaciones de TIN se dividieron en dos partes basándose en los valores medios para cada uno de los 80 os con datos. Los individuos con relaciones elevadas de expresión de TIN de miR-21 tuvieron un  
10 peor pronóstico de supervivencia basándose en el análisis de Kaplan Meier ( $p = 0,004$ ) sugiere que los tumores que expresan altos niveles de miR-21 son predictivos de un mal pronóstico. Estos resultados se analizaron adicionalmente con análisis de regresión de Cox.

15 Los individuos con relaciones de TIN de miR-21 elevadas tenían mayor riesgo con análisis tanto univariado ( $HR = 3,0$ ;  $p = 0,01$ ) como multivariado ( $HR = 2,8$ ;  $p = 0,02$ ) ajustando por edad, género, raza y estadificación de TNM (Tabla 9).

20 Este resultado sugiere que los niveles expresión de miR-21 puede ser útiles como métodos de predicción de pronóstico y pueden proporcionar valores más predictivos de pronóstico de supervivencia que la estadificación de TNM por sí sola. Se ha encontrado que mir-21 se expresa diferencialmente en muchos tipos de tumores<sup>12-18</sup>.

Los estudios también han demostrado que niveles elevados de miR-21 pueden conducir a una inhibición de la apoptosis en células de glioblastoma<sup>5</sup> mientras que la inhibición de miR-21 puede conducir a una mayor proliferación celular en células HeLa<sup>19</sup>.

25 En el presente documento, los inventores han descubierto que actualmente se cree que miR-21 contribuye a la carcinogénesis de colon de una manera similar.

Nosotros hemos encontrado que miR-106a elevado en tumores (Tabla 7) y las relaciones de TIN del miR-106a están asociadas con el pronóstico de supervivencia (Tabla 9, Figura 8b).

- 5 MiR-106a es un miembro de una clase de miARN parálogos que incluyen miR-17, miR-20, miR-106a, y miR-106h<sup>20</sup>. Estos miARN son muy similares entre sí en qué difieren solamente en 1-2 nucleótidos. Debido a su similitud, es probable que tengan dianas similares. De modo interesante, los cuatro de estos miARN muestran patrones similares de expresión y asociaciones con pronóstico (no se muestran los datos). En el presente documento presentamos asociaciones de miR-106a, pero no descartamos formalmente la posibilidad de que cualquiera o todos los otros
- 10 parálogos de miARN están contribuyendo a esta asociación. Las relaciones de TIN de miR-106a se dividieron en dos partes basándose en los valores medios para cada uno de los 82 individuos con datos. Los individuos con relaciones de expresión de TIN de miR-106a elevadas presentaron peor pronóstico de supervivencia basándose en el análisis de Kaplan Meier ( $p = 0,013$ ; Figura 8b).
- 15 Esto sugiere que los tumores que expresan niveles elevados de miR-106a son predictivos de un mal pronóstico de supervivencia. Los individuos con elevadas relaciones de TIN de miR-106a presentaron un riesgo más elevado con análisis tanto univariado (FIR = 2,6,  $p = 0,01$ ) como multivariado (HR = 2,4;  $p = 0,05$ ) ajustando por edad, género, raza y estadificación de TNM (Tabla 7). Por lo tanto, miR-106a puede ser un indicador de pronóstico útil para el pronóstico de cáncer de colon independientemente de la estadificación de TNM. De modo interesante, se ha
- 20 mostrado que el gen supresor del tumor Retinoblastoma es una diana funcional de miR-106a<sup>12</sup>, lo que apoya un mecanismo de cómo miR-106a puede contribuir mecánicamente a la carcinogénesis de colon.

La sobreexpresión del grupo miR-17-92 cluster, que contiene parálogos de miR-106a, dio como resultado el desarrollo acelerado de tumores en ratones<sup>10</sup>. Este experimento muestra que los miARN de la familia miR-106a son capaces de afectar a la carcinogénesis reforzando adicionalmente la hipótesis de que miR-106a puede estar contribuyendo a la carcinogénesis y a la progresión del tumor.

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

30 Existe una tendencia en la que los individuos con estadificación de TNM más avanzada tienen relaciones de TIN más elevadas para/et-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).

35 Las relaciones de TIN se dividieron en dos partes basándose en la media (miR-16h, miR-29a, miR-103-2, miR-203) o el cuartil más elevado (let-7g, miR-10a, miR-181h) el análisis de Kaplan Meier reveló que se encontró que las relaciones elevadas de TIN para cada uno eran indicadores de un mal pronóstico de supervivencia (Figura 8c-8i).

40 El análisis de regresión de Cox multivariada y univariado confirmó que las elevadas relaciones de TIN de uno cualquiera de estos miARN era predictivo de mal pronóstico de cáncer de colon independientemente de la estadificación de TNM (Tabla 9). Los modelos de regresión de Cox multivariada que se ajustaban por edad, género, raza y estadificación de TNM mostraron que cada una de las relaciones elevadas de TIN para miR-16b (HR = 5,1;  $p = 0,003$ ), Jet-7g (HR = 2,5;  $p = 0,03$ ), miR-10a (HR = 3,4;  $p = 0,003$ ), miR-29a (HR = 3,2;  $p = 0,01$ ), miR-103-2 (HR = 3,1;  $p = 0,01$ ), miR-181h (HR = 3,2;  $p = 0,01$ ), y miR-203 (HR = 3,2;  $p = 0,03$ ) eran delictivas de un mal pronóstico de supervivencia. Estos resultados sugerían que los pacientes con tumores que expresan niveles elevados de cualquiera de estos miARN están en un mayor riesgo de fallecer 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 los riesgos de supervivencia en pacientes con cáncer de colon independientemente de la estadificación.

#### 50 **La firma de la expresión de miARN de 9 miARN predice el pronóstico de supervivencia:**

Nosotros usamos las relaciones de TIN para todos los 9 miARN que se han mencionado anteriormente porque desarrollan una firma de miARN que se podría usar para predecir el pronóstico de cáncer de colon. Los individuos que pierden más de 2 de 9 de estos valores se excluyeron de este análisis. El agrupamiento jerárquico de las relaciones de TIN de los 9 miARN dio como resultado el agrupamiento de los 78 pacientes restantes en dos grupos (Figura 9a).

60 Estos grupos presentaron pronósticos de supervivencia significativamente diferentes (Figura 9b;  $p = 0,004$ ). El análisis de regresión de Cox univariado (HR = 3,2,  $p = 0,008$ ) y multivariado (HR = 2,8;  $p = 0,04$ ) demostró que la firma de mi ARN estaba asociada con un mal pronóstico de supervivencia independientemente de la estadificación de TNM (Tabla 10).

**Tabla 10** - Análisis de regresión de Cox con firma de microARN

Análisis Univariado		
Variable	HR (CI al 95 %)	valor de p
9 miR Grupo B/A	3,2 (1,4 - 7,8)	0,008
Multivariado, ajustando por edad, género y raza		
Variable	HR (CI al 95 %)	valor de 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
masculino/femenino	1,9 (0,6 - 6,6)	0,29
AA/Caucásica	0,9 (1,4 - 10,7)	0,82
Estadio III-IV / Estadio I - II	3,9 (1,4 - 10,7)	0,007

Los análisis de regresión de Cox univariado (arriba) y multivariado (ajustando por edad, género, raza y estadificación; abajo) se realizaron para mostrar que los individuos clasificados en el grupo B que usa la firma de 9 miARN tenían mayor riesgo de fallecer por cáncer de colon. Ni la edad, ni el género ni la raza contribuyeron significativamente al riesgo de supervivencia. Este riesgo asociado con la asignación del grupo es independiente de la estadificación.

Estos resultados demuestran que las firmas de miARN se pueden usar como un biomarcador para predecir el pronóstico de supervivencia de pacientes con cáncer de colon.

### Discusión

miARN individuales se expresan diferencialmente en tumores de colon<sup>12,13</sup> porque sugiere que la expresión alterada de estos miARN puede ser parte de los cambios celulares responsables de la carcinogénesis de colon. Además de estos hallazgos, nos mostramos en el presente documento 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, se pueden usar como biomarcadores que permitirán a los médicos predecir el riesgo de supervivencia de un paciente con más precisión.

Las fuertes asociaciones con las relaciones de TIN de miARN con pronóstico de supervivencia sugieren que la expresión alterada de miARN puede ser parte de la ruta causal en la carcinogénesis de colon y la progresión. Si la expresión alterada de cualquiera de estos miARN es causal a la carcinogénesis, puede ser posible diseñar compuestos farmacéuticos de tipo antagonistas que se pueden usar para tratar el cáncer. Usando formación de perfiles de miARN y agentes terapéuticos basados en miARN, puede ser posible diseñar estrategias de tratamiento con fármacos personalizados basándose en cuáles de estos nueve miARN están alterados. Además, estas estrategias pueden ser útiles en la prevención de cáncer de colon en personas que tienen alto riesgo debido a riesgos heredados genéticamente por historia de cáncer previo.

### Ejemplo 3

#### Métodos, reactivos y kits para pronóstico, estadificación, pronóstico, supervisión y tratamiento de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon.

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

Los marcadores están seleccionados de modo que el valor predictivo positivo de los métodos es de al menos aproximadamente un 10 %, y en determinadas realizaciones no limitantes, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 50 % o aproximadamente un 90 %. Para uso en los métodos también se prefieren marcadores que se expresan diferencialmente, en comparación con células normales, al menos en dos veces en al menos aproximadamente un 20 %, y en determinadas realizaciones no limitantes, aproximadamente un 50 % o

aproximadamente un 75 %.

En un método de pronóstico para evaluar si un paciente está afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon (por ejemplo, nueva detección ("identificación sistemática"), detección de recurrencia, ensayo de reflejos), el método comprende comparar: a) el nivel de la expresión de un marcador en una muestra del paciente, y b) el nivel normal de la expresión del marcador en una muestra de enfermedad relacionada con el cáncer de no colon de control. Un nivel significativamente más elevado de la expresión del marcador en la muestra del paciente en comparación con el nivel normal es una indicación de que el paciente está afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

además se proporcionan métodos de pronóstico para evaluar la eficacia de una terapia para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente. Dichos métodos comprenden comparar: a) 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) expresión del marcador en una segunda muestra obtenida del paciente después de administrar la parte de la terapia. Un nivel significativamente más bajo de la expresión del marcador en la segunda muestra con respecto a ésta en la primera muestra es una indicación de que la terapia es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente.

Se observará que en estos métodos la "terapia" puede ser cualquier terapia para tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon que incluye, pero no se limita, composiciones farmacéuticas, terapia genética y terapia biológica tal como la administración de anticuerpos y quimioquinas. Por lo tanto, los métodos que se describen en el presente documento se pueden usar para evaluar a un paciente antes, durante y después de la terapia, por ejemplo, para evaluar la reducción en un estado de enfermedad.

En determinados aspectos, los métodos de pronóstico están dirigidos a la terapia que usa un agente químico o biológico. Estos métodos comprenden comparar: a) la expresión de un marcador en una primera muestra obtenida del paciente y mantenida en presencia del agente químico o biológico, y b) la expresión del marcador en una segunda muestra obtenida del paciente y mantenida en ausencia del agente. Un nivel significativamente más bajo de la expresión del marcador en la segunda muestra con respecto a ésta en la primera muestra es una indicación de que el agente es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente. En una realización, la primera y la segunda muestras pueden ser porciones de una sola muestra obtenida del paciente o partes de nuestras agrupadas obtenidas del paciente.

Además se proporciona un método de supervisión para evaluar la progresión de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente, método que comprende: a) detectar en una muestra de paciente en un primer punto temporal, la expresión de un marcador; b) repetir la etapa a) en un punto temporal posterior en el tiempo; y c) comparar el nivel de la expresión detectado en las etapas a) y b), y a partir de los mismos supervisar la progresión de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente. Un nivel significativamente más elevado de la expresión del marcador en la muestra en el punto temporal posterior a partir del de la muestra en el primer punto temporal es una indicación de que la enfermedad relacionada con el cáncer de colon ha avanzado, mientras que un nivel significativamente menor de expresión es una indicación de que la enfermedad relacionada con el cáncer de colon ha retrocedido.

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

Además se proporciona un método de ensayo para seleccionar una composición para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente. Este método comprende las etapas de: a) obtener una muestra que comprende células del paciente; b) mantener separadamente alícuotas de la muestra en presencia de una pluralidad de composiciones del ensayo; c) comparar la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas; y d) seleccionar una de las composiciones del ensayo que reduce significativamente el nivel de la 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 del ensayo.

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

Además, se proporciona adicionalmente un método para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente. Este método comprende las etapas de: a) obtener una muestra que comprende células del paciente; b) mantener separadamente 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 disminuye significativamente el nivel de expresión del marcador en la alícuota que contiene esa composición, con respecto a los niveles de la expresión del marcador en presencia de las otras composiciones.

El nivel de expresión de un marcador en una muestra se puede evaluar, por ejemplo, mediante la detección de la presencia en la muestra de: la correspondiente proteína marcadora o un fragmento de la proteína (por ejemplo, mediante el uso de un reactivo, tal como un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o anticuerpo de una sola cadena, que se une específicamente con la proteína o fragmento de proteína) el correspondiente ácido nucleico marcador (por ejemplo, un transcrito de nucleótido, o un complemento del mismo), o un fragmento del ácido nucleico (por ejemplo, poniendo en contacto polinucleótidos transcritos obtenidos a partir de la muestra con sustrato que tiene fijado a esto uno o más ácidos nucleicos que tienen toda o un segmento de la secuencia de ácidos nucleicos o un complemento de la misma) un metabolito que se produce directamente (es decir, se cataliza) o indirectamente mediante la correspondiente proteína marcadora.

Cualquiera de los métodos que se han mencionado anteriormente se pueden realizar usando al menos una o una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 5, o 10 o más) de marcadores de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon, que incluyen marcadores de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon.

En dichos métodos, el nivel de la expresión en la muestra de cada una de una pluralidad de marcadores, al menos uno de los cuales es un marcador, se compara con el nivel normal de la expresión de cada una de la pluralidad de marcadores en muestras del mismo tipo obtenidas a partir de humanos de control no afectados con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Un nivel de expresión alterado significativamente (es decir, aumentado o disminuido tal como se especifica en los métodos que se han descrito anteriormente que usan un solo marcador) en la muestra de uno o más marcadores, o alguna combinación de los mismos, con respecto a ese nivel normal o de control correspondiente del marcador, es una indicación de que el paciente está afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Para todos los métodos que se han mencionado anteriormente, el marcador o marcadores se seleccionan de modo que el valor predictivo positivo del método sea de al menos aproximadamente un 10 %.

En otro aspecto, se proporcionan diversos kits de pronóstico y de ensayo. En una realización, un kit es útil para evaluar si un paciente está afectado con una enfermedad relacionada con el 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 el 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 más, los kits son útiles para evaluar la presencia de células de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon o tratar enfermedades relacionadas con el 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 anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en los que la pluralidad los agentes 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 de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon, en la 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 tratar un paciente afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o con el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el 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 polinucleótido complementario con un ácido nucleico marcador, o un segmento del mismo. Por ejemplo, un polinucleótido antisentido se puede proporcionar al paciente a través de la administración de un vector que expresa un polinucleótido antisentido de un ácido nucleico marcador un fragmento del mismo. En otra realización, el método comprende proporcionar al paciente un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se une específicamente con una proteína marcadora, o un fragmento de la proteína.

En un amplio aspecto, se proporciona un método para producir un modelo animal no humano para la evaluación de al menos una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. El método incluye la exposición del animal a dosis repetidas de al menos un agente químico que se cree que causa 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 inicio o desarrollo potencial de cáncer de colon.

En un amplio aspecto, se proporciona un método para producir el modelo animal que incluye: mantener el animal en un entorno específico sin agentes químicos y sensibilizar al animal con al menos un agente químico que se cree que causa cáncer de colon. En determinadas realizaciones, al menos una parte del colon del animal está sensibilizada con múltiples exposiciones secuenciales.

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

El modelo animal es útil para evaluar una o más rutas metabólicas que contribuyen a al menos una de inicio, progresión, gravedad, patología, agresividad, grado, actividad, discapacidad, mortalidad, morbilidad, su clasificación de la enfermedad u otra característica patógena o patológica subyacente de al menos una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. El análisis se puede realizar con uno o más de: agrupamiento jerárquico, construcción de la red de firmas, análisis proteómico por espectroscopía de masas, resonancia de plasmones superficiales, formación de modelos estadísticos lineales, análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales, y análisis de regresión lineal múltiple.

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

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado tal como normalmente lo entiende un experto habitual en la materia (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Las técnicas convencionales se usan para métodos moleculares, génicos y bioquímicos que están dentro de la experiencia en la materia. Dichas técnicas explican totalmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Mullis y col. Pat. 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); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller y Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu y col. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1936); The Laboratory Rat, jefe de redacción: Mark A. Suckow; autores: Sharp y LaRegina. CRC Press, Boston, 1988) y métodos químicos.

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

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

Los artículos "un" y "uno" se usan en el presente documento para referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" se refiere a un elemento o a más de un elemento.

Un "marcador" es un gen o proteína cuyo nivel alterado de la expresión en un tejido celular a partir de su nivel de expresión en tejido o célula normal o sano está asociado con un estado de enfermedad.

El nivel de expresión "normal" de un marcador es el nivel de la expresión del marcador en células del sistema de colon de un sujeto o paciente humano no afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

Una "sobrexpresión" o "nivel de expresión significativamente más elevado" de un marcador se refiere a un nivel de expresión en una muestra de ensayo que es mayor que el error estándar del ensayo usado 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, muestra de un sujeto sano que no presenta la enfermedad asociada con el marcador) y en determinadas realizaciones, en nivel de expresión promedio del marcador en varias muestras de 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 menor que el nivel de expresión del marcador en una muestra de control (por ejemplo, muestra de un sujeto sano que no presenta la enfermedad asociada con el marcador) y en determinadas realizaciones, en nivel de expresión promedio del marcador en varias muestras de control.

Un kit es cualquier producto manufacturado (por ejemplo, un envase o recipiente) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, una sonda, para detectar específicamente la expresión de un marcador. El kit se puede promover, distribuir o vender en forma de una unidad para realizar los métodos de la presente invención.

"Proteínas" incluye proteínas marcadoras y sus fragmentos; proteínas marcadoras variables y sus fragmentos; péptidos y polipéptidos que comprenden al menos un segmento de 15 aminoácidos de proteína marcadora o marcadora variable; y proteínas de fusión que comprenden una proteína marcadora o marcadora variable, o al menos un segmento de 15 aminoácidos de una proteína marcadora o marcadora variable.

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

### **Métodos de Identificación Sistemática**

Los modelos animales creados con los métodos que se describen en el presente documento permitirán la identificación sistemática de agentes terapéuticos útiles para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Por consiguiente, los métodos son útiles para identificar agentes terapéuticos para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Los métodos comprenden administrar un agente candidato a un modelo animal preparado con los métodos que se describen en el presente documento, evaluar al menos una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el modelo animal en comparación con un modelo animal de control al que no se ha administrado el agente candidato. Si al menos una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon se reduce en síntomas o se retrasa en su inicio, el agente candidato es un agente para tratar o prevenir la enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

Los agentes candidatos pueden ser agentes farmacológicos ya conocidos en la técnica o pueden ser agentes que anteriormente se desconocía que tenían cualquier actividad farmacológica. Los agentes pueden ser de origen natural se pueden diseñar en el laboratorio. Se pueden aislar a partir de microorganismos, animales o plantas, o se pueden producir de forma recombinante, o sintéticas mediante cualquier método químico adecuado. Pueden ser moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos o peptido miméticos. En determinadas realizaciones, los agentes candidatos son compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular mayor que 50 y menor que aproximadamente 2.500 daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas. Los agentes candidatos también se encuentran entre biomoléculas que incluyen, pero no se limitan a: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los agentes candidatos se obtienen a partir de una gran diversidad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Existen, por ejemplo, numerosos medios disponibles para síntesis aleatoria y

dirigida de una gran diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos al azar. Como alternativa, bibliotecas de compuestos naturales en forma de estratos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Además, las bibliotecas y compuestos producidos de forma natural o sintética natural se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y se pueden usar para producir bibliotecas combinatorias. En determinadas realizaciones, los agentes candidatos se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos enfoques en la técnica de los métodos de biblioteca combinatoria, que incluyen, como ejemplo no limitante: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase sólida paralela o en fase de disolución direccionables espacialmente; métodos de biblioteca sintética que requieren desconvolución; el método de biblioteca "una perla un compuesto"; y métodos de biblioteca sintética que usan selección por cromatografía de afinidad.

En determinadas realizaciones adicionales, determinados agentes farmacológicos se pueden someter 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 tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon también se pueden usar para validar compuestos/agentes candidatos generados a partir de estudios in vitro.

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

#### **Métodos para tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon**

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar, inhibir, aliviar o revertir una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon. En los métodos que se describen en el presente documento, un agente que interfiere con una cascada de señalización se administra a un individuo con necesidad del mismo, tal como, pero no limitado a, pacientes con enfermedades relacionadas con el cáncer de colon en los que dichas complicaciones aún no son evidentes y en los que ya han tenido al menos una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

En el primer caso, dicho tratamiento es útil para prevenir la aparición de dicha respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon y/o reducir el grado en el que se producen. En el último caso, dicho tratamiento es útil para reducir el grado de que se produce dicha respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon, prevenir su desarrollo adicional o revertir la respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

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

#### **Expresión de un marcador**

La expresión de un marcador se puede inhibir en un número de formas, que incluyen, a modo de un ejemplo no limitante, un oligonucleótido antisentido que se puede proporcionar a las células de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon para inhibir la transcripción, traducción, o ambas, del marcador o marcadores. Como alternativa, un polinucleótido que codifica a un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una proteína marcadora, y se une operativamente con una región promotora/reguladora propia, se puede proporcionar a la célula para generar anticuerpos intracelulares que inhibirán la función o la actividad de la proteína. La expresión y/o función de un marcador también se puede inhibir mediante el tratamiento de la célula de la enfermedad relacionada con el cáncer de colon con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una proteína marcadora. Usando los métodos que se describen en el presente documento, diversas moléculas, que incluyen particularmente moléculas lo suficientemente pequeñas que son capaces de cruzar la membrana celular, se pueden identificar sistemáticamente para identificar moléculas que inhiben la expresión de un marcador por inhiben la función de una proteína marcadora. El compuesto identificado de este modo se puede proporcionar al paciente para inhibir células de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon del paciente.

Cualquier marcador o combinación de marcadores, así como cualquier marcador determinado en combinación con los marcadores, se pueden usar en las composiciones, kits y métodos que se describen en el presente documento. En general, es deseable usar marcadores para los que la diferencia entre el nivel de la expresión del marcador en células de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon y el nivel de expresión del mismo marcador en células del sistema 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 estándar 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 el tejido normal.

Se reconoce que determinadas proteínas marcadoras se secretan al espacio extracelular que rodea a las células. Estos marcadores se usan en determinadas realizaciones de las composiciones, kits y métodos, debido al hecho de que dichas proteínas marcadoras se pueden detectar en una muestra de fluido corporal asociada con el cáncer de colon, que se puede recoger más fácilmente de un paciente humano que de una muestra de biopsia del tejido.

5 Además, las técnicas in vivo hasta detección de una proteína marcadora incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto se puede detectar mediante técnicas de formación de imágenes convencionales.

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

15 Se observará que muestras de pacientes que contienen células de colon se pueden usar en los métodos que se describen en el presente documento. En estas realizaciones, el nivel de la expresión del marcador se puede evaluar mediante la evaluación de la cantidad (por ejemplo, cantidad concentración absoluta) del marcador en una muestra. La muestra celular, por supuesto, se puede someter a diversas técnicas preparativas y de almacenamiento después de la recogida (por ejemplo, extracción de ácidos nucleicos y/o proteínas, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación, etc.) antes de evaluar la cantidad del marcador en la muestra.

20 También se observará que los marcadores se pueden separar las células en el sistema digestivo, el torrente sanguíneo y/o espacios intersticiales. Los marcadores separados se pueden someter a ensayo, por ejemplo, mediante examen del suero o del plasma.

Las composiciones, kits y métodos se pueden usar para detectar la expresión de proteínas marcadoras que tienen al menos una parte que se presenta sobre la superficie de las células que expresan. Por ejemplo, se pueden usar métodos inmunológicos para detectar dichas proteínas en células enteras, o se pueden usar métodos de análisis de secuencias por ordenador para predecir la presencia de al menos un dominio extracelular (es decir, que incluye tanto proteína secretadas como 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 expresa se puede detectar sin lisar necesariamente la célula (por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente con un dominio de la superficie celular de la proteína).

30 La expresión de un marcador se puede evaluar mediante cualquiera de una gran diversidad de métodos para detectar la expresión de un ácido nucleico o proteína transcritos. Los ejemplos no limitantes de dichos métodos incluyen métodos inmunológicos para la detección de proteínas secretadas, de superficie celular, citoplásmicas o nucleares, métodos de purificación de proteínas, ensayos de función o actividad de proteínas, métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos y métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

45 En una realización en 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 proteína-ligando), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de una sola cadena, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente con una proteína marcadora o fragmento de la misma, que incluye una proteína marcadora que ha experimentado toda o una parte de su modificación posterior a la traducción normal.

50 En otra realización en particular, la expresión de un marcador se evalúa preparando mARN/cADN (es decir, un polinucleótido transcrito) a partir de células en una muestra del paciente, y mediante hibridación del mARN/cADN con un polinucleótido de referencia que es un complemento de un ácido nucleico marcador, o un fragmento del mismo. Opcionalmente, cADN se puede amplificar usando cualquiera de diversos métodos de reacción en cadena de la polimerasa antes de hibridación con el polinucleótido de referencia; preferentemente, no está amplificado. La expresión de uno o más marcadores se puede detectar del mismo modo usando PCR cuantitativa para evaluar el nivel de la expresión del marcador o marcadores. Como alternativa, cualquiera de los muchos métodos de detección de mutaciones o variantes (por ejemplo, polimorfismos de nucleótidos individuales, supresiones, etc.) de un marcador se puede usar para detectar la aparición de un marcador en un paciente.

60 En una realización relacionada, una mezcla de polinucleótidos transcritos obtenidos a partir de la muestra se pone en contacto con un sustrato que tiene fijado en el mismo un polinucleótido complementario con 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 con u homólogos con se detectan de forma diferencial en el sustrato (por ejemplo, se detectan usando diferentes cromóforos o fluoróforos, o se fijan a diferentes posiciones seleccionadas), entonces los niveles de expresión de una pluralidad de marcadores se pueden evaluar

simultáneamente usando un solo sustrato (por ejemplo, una micromatriz de "chip de gen" de polinucleótidos fijados a posiciones seleccionadas). Cuando se usa un método para evaluar la expresión de marcadores que implica hibridación de un ácido nucleico con otro, es deseable que la hibridación se realice en condiciones estrictas de hibridación.

5 En determinadas realizaciones, los ensayos de biomarcadores se pueden realizar usando espectrometría de masas o resonancia de plasmones superficiales. En diversas realizaciones, el método para identificar un agente activo frente a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon puede incluir a) proporcionar una muestra de células que contiene uno o más marcadores o derivados de los mismos; b) preparar un extracto a partir de dichas células; c) 10 mezclar dicho extracto con una sonda de ácido nucleico marcado que contiene un sitio de unión al marcador; y, d) determinar la formación de un complejo entre el marcador y la sonda de ácido nucleico en presencia o ausencia del agente de ensayo. La etapa de determinación puede incluir someter a dicha mezcla de sonda de extracto/ácido nucleico a un ensayo de desplazamiento de movilidad por electroforesis.

15 En determinadas realizaciones, la etapa de determinación comprende un ensayo seleccionado entre un ensayo de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA), ensayos basados en fluorescencia y ensayos de rendimiento ultra elevado, por ejemplo ensayos de resonancia de plasmones superficiales (SPR) o de espectroscopia de correlación por fluorescencia (FCS). En dicha realizaciones, el sensor de SPR es útil para dirigir la observación en tiempo real de interacciones biomoleculares ya que SPR es sensible a cambios de índices de refracción insignificantes en una 20 superficie de metal dieléctrico. SPR es una técnica de superficie que es sensible a cambios de  $10^5$  a  $10^6$  unidades de índice de refracción (RI) dentro de aproximadamente 200 nm de la superficie de contacto del sensor/muestra de SPR. Por lo tanto, la espectroscopia de SPR es útil para supervisar el crecimiento de películas orgánicas finas depositadas en la capa de detección.

25 Debido a que las composiciones, kits, y métodos dependen de la detección de la 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 mínimo de detección del método usado para evaluar la expresión en al menos una de células normales y células afectadas por cáncer de colon.

30 Se entiende que mediante identificación sistemática de rutina de muestras adicionales de pacientes usando uno o más de los marcadores, se observará que determinados de los marcadores se sobreexpresan en el células de diversos tipos, huyendo enfermedades específicas relacionadas con el cáncer de colon.

Además, como un mayor número de muestras de pacientes se evaluaron para la expresión de los marcadores y los 35 resultados de los pacientes individuales de los que se obtuvieron las muestras están correlacionados, también se confirmará que la expresión alterada de determinados de los marcadores está fuertemente correlacionada con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon y que la expresión alterada de los otros marcadores esta fuertemente correlacionada con otras enfermedades. Por lo tanto, las composiciones, kits, y métodos son útiles para caracterizar uno o más del estadio, grado, tipo histológico, y naturaleza de una enfermedad relacionada con el 40 cáncer de colon en pacientes.

Cuando las composiciones, kits, y métodos se usan para caracterizar uno o más del estadio, grado, tipo histológico, y naturaleza de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente, se desea que el marcador o 45 panel de marcadores esté seleccionado de modo que se obtenga un resultado positivo en al menos aproximadamente un 20 %, y en determinadas realizaciones, al menos aproximadamente un 40 %, un 60 %, o un 80 %, y en básicamente todos los pacientes afectados con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon del correspondiente estadio, grado, tipo histológico, o naturaleza. El marcador o panel de marcadores de la invención se puede seleccionar de modo que se obtenga un valor predictivo positivo mayor que aproximadamente un 10 % para la población en general (en un ejemplo limitante, acoplado con una especificidad del ensayo mayor que un 80 %).

50 Cuando se usa una pluralidad de marcadores en las composiciones, kits, y métodos, el nivel de expresión de cada marcador en una muestra del paciente se puede comparar con el nivel de expresión normal de cada una de la pluralidad de marcadores en 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 55 de reacción individuales que corresponden a uno o más de los marcadores. En una realización, un nivel de expresión aumentado significativamente de más de uno de la pluralidad de marcadores en la muestra, con respecto a los niveles normales correspondientes, es una indicación de que el paciente está afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Cuando se usa una pluralidad de marcadores, se pueden usar 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 20, 30, o 50 o más marcadores individuales; el determinadas realizaciones, se puede desear el uso de unos 60 pocos marcadores.

Para maximizar la sensibilidad de las composiciones, kits, y métodos (es decir, por interferencia atribuible a células que tienen origen en el sistema que no es de colon en una muestra del paciente), es deseable que el marcador 65 usado los mismos sea un marcador que tenga una distribución tisular restringida, por ejemplo, normalmente no expresada en un sistema de tejido que no es de colon.

Se reconoce que las composiciones, kits, y métodos serán de una utilidad en particular para pacientes que tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon y sus consultores médicos. Pacientes en los que se reconoce que tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon incluyen, por ejemplo, pacientes que tienen una historia familiar de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

El nivel de expresión de un marcador en tejido normal del sistema del colon se puede evaluar de diversas formas. En una realización, este nivel de expresión normal se evalúa mediante la evaluación del nivel de expresión del marcador en una parte de las células del sistema del colon que parecen ser normales y por comparación de este nivel de expresión normal con el nivel de expresión en una parte de las células del sistema del colon que se sospecha que son anómalas. Como alternativa, y particularmente ya que la información adicional se hace disponible como resultado de la actuación de rutina de los métodos que se describen en el presente documento, se pueden usar valores promedio de población para la expresión normal de los marcadores. En otras realizaciones, el nivel de expresión 'normal' de un marcador se puede determinar mediante la evaluación de la expresión del marcador en una muestra del paciente obtenida a partir de un paciente afectado por cáncer que no es de colon, a partir de una muestra del paciente obtenida a partir de un paciente antes de que se sospeche el inicio de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente, a partir de muestras del paciente archivadas, y similares.

En el presente documento también se proporcionan composiciones, kits, y métodos para evaluar la presencia de células de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon en una muestra (por ejemplo, una muestra archivada de tejido o una muestra obtenida de un paciente). Estas composiciones, kits, y métodos son básicamente las mismas que las que se han descrito anteriormente, excepto en que, cuando sea necesario, las composiciones, kits, y métodos se adaptan para uso con muestras distintas de las muestras del paciente. Por ejemplo, cuando la muestra a usar es una muestra de tejido humano archivado, en parafina, puede ser necesario ajustar la relación de compuestos en las composiciones, en los kits, o los métodos usados para evaluar niveles de la expresión de marcadores en la muestra.

#### **Kits y reactivos**

Los kits son útiles para evaluar la presencia de células de enfermedades relacionadas con el 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 es capaz de unirse específicamente con un marcador de ácido nucleico o proteína. Reactivos adecuados para la unión con una proteína marcadora incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y similares. Reactivos adecuados para unirse con un ácido nucleico marcador (por ejemplo, un ADN genómico, un MARN, un MARN empalmado, un cADN, o similares) incluyen ácidos nucleicos complementarios. Por ejemplo, los reactivos de ácido nucleico pueden incluir oligonucleótidos (marcados o no marcados) fijados a un sustrato, oligonucleótidos marcados no unidos con un sustrato, pares de cebadores de PCR, sondas baliza molecular, y similares.

Los kits pueden comprender opcionalmente componentes adicionales útiles para realizar los métodos que se describen en el presente documento. A modo de ejemplo, el kit pueden comprender fluidos (por ejemplo, tampón de SSC) adecuados para hibridar ácidos nucleicos complementarios o para la unión de un anticuerpo con una proteína con la que se une específicamente, uno o más compartimentos de la muestra, un material didáctico que describe el comportamiento del método, una muestra de células normales del sistema del colon, una muestra de células de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon, y similares.

#### **Método para producir anticuerpos**

En el presente documento también se proporciona un método para preparar un hibridoma aislado que produce un anticuerpo útil para evaluar si un paciente está afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. En este método, una proteína o un péptido que comprenden la totalidad o un segmento de una proteína marcadora se sintetiza o se aísla (por ejemplo, mediante purificación a partir de una célula en la que se expresa o mediante transcripción y traducción de un ácido nucleico que codifica la proteína o el 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. El vertebrado se puede inmunizar opcionalmente (y preferentemente) al menos una vez adicional con la proteína o el péptido, de modo que el vertebrado presenta una respuesta inmune fuerte a la proteína o el péptido. Los esplenocitos se aíslan a partir del vertebrado inmunizado y se funden con una línea celular inmortalizada para formar hibridomas, usando cualquiera de diversos métodos. Los hibridomas formados de esta manera se identifican sistemáticamente a continuación usando métodos convencionales para identificar uno más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente con la proteína marcadora fragmento de la misma. Además, en el presente documento se proporcionan hibridomas preparados con este método y anticuerpos preparados 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 de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon. Tal como se ha descrito anteriormente, las diferencias en el nivel de expresión de los marcadores se correlacionan con el estado anómalo de las células del sistema del colon. Aunque se reconoce que cambios en los niveles de expresión de determinados marcadores probablemente resultan del estado anómalo de las células del sistema del colon, del mismo modo se reconoce que cambios en los niveles de expresión de otros de los marcadores inducen, mantienen, y promueven el estado anómalo de esas células. Por lo tanto, los compuestos que inhiben una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente causarán que el nivel de expresión de uno o más de los marcadores cambie a un nivel más cercano al nivel de expresión normal para ese marcador (es decir el nivel de expresión para el marcador en células normales del sistema del colon).

Por lo tanto, este método comprende comparar la expresión de un marcador en una primera muestra de células de colon y mantenerla en presencia del compuesto de ensayo y la expresión del marcador en una segunda muestra de células de colon y mantener la 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 el cáncer de colon. Las muestras de células de colon, por ejemplo, puede ser alícuotas de una sola muestra de células normales de colon obtenidas a partir de un paciente, muestras combinadas de células normales de colon obtenidas a partir de un paciente, células de una línea celular de colon normal, alícuotas de una sola muestra de células de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon obtenidas a partir de un paciente, muestras combinadas de células de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon obtenidas a partir de un paciente, células de una línea celular de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon, o similares.

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

Este método se puede usar del mismo modo para evaluar la eficacia de la terapia para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente. En este método, se evalúa el nivel de expresión de uno o más marcadores en un par de muestras (uno sometido a la terapia, el otro no sometido a la terapia). Al igual que con el método para evaluar la eficacia de compuestos de ensayo, si la terapia induce un nivel de expresión significativamente más bajo de un marcador, entonces la terapia es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Como anteriormente, si en este método se usan muestras de un paciente seleccionado, entonces se pueden evaluar terapias alternativas in vitro para seleccionar una terapia que probablemente sea más eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente.

Tal como se describe en el presente documento, el estado anómalo de las células de colon humano está correlacionado con cambios en los niveles de expresión de los marcadores. Además se proporciona un método para evaluar el potencial nocivo de un compuesto de ensayo. Este método comprende mantener alícuotas separadas de células de colon humano en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. La expresión de un marcador en cada una de las alícuotas se compara. Un nivel de expresión significativamente elevado 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 potencial dañino. El potencial dañino relativo de diversos compuestos de ensayo se puede evaluar por comparación del grado de aumento o inhibición del nivel de expresión de los marcadores relevantes, mediante comparación del número de marcadores para los que el nivel de expresión aumenta o se inhibe, o por comparación de ambos.

Diversos aspectos se describen con detalle adicional en las siguientes subsecciones.

**Proteínas y anticuerpos aislados**

Un aspecto pertenece a proteínas marcadoras aisladas y partes biológicamente activas de las mismas, así como fragmentos polipeptídicos adecuados para su uso como agentes inmunógenos para generar anticuerpos dirigidos contra una proteína marcadora o un fragmento de la misma. En una realización, la proteína marcadora nativa se puede aislar a partir de fuentes celulares o tisulares mediante un esquema de purificación apropiada usando técnicas convencionales de purificación de proteínas. En otra realización, una proteína o un péptido que comprende toda o un segmento de la proteína marcadora se produce mediante técnicas de ADN recombinante. De forma alternativa a la expresión recombinante, dicha proteína o péptido se pueden sintetizar químicamente usando técnicas convencionales para síntesis de péptidos.

Una proteína "aislada" o "purificada" o partes biológicamente activa de la misma está básicamente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes a partir de la fuente celular o tisular de la que se deriva la proteína, o básicamente libre de precursores químicos o de otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "básicamente libre de material celular" incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se

separa de componentes celulares de las células a partir de las que se aísla o de forma recombinante. Por lo tanto, la proteína que está básicamente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas que tienen menos de aproximadamente un 30 %, un 20 %, un 10 %, o un 5 % (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en el presente documento como "proteína contaminante").

5 Cuando la proteína o parte biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, preferentemente también está básicamente libre de medios de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20 %, un 10 %, o un 5 % del volumen de la preparación de proteínas. Cuando la proteína se produce por síntesis química, preferentemente está básicamente libre de precursores químicos o de otros agentes químicos, es decir, se separa de los precursores químicos de otros agentes químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, dichas preparaciones de proteína tienen menos de aproximadamente un 30 %, un 20 %, un 10 %, un 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del polipéptido de interés.

15 Partes biológicamente activas de una proteína marcadora incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora, que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa, y presentan al menos una actividad de la correspondiente proteína de longitud completa. Por lo general, partes biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la correspondiente proteína de longitud completa. Una parte biológicamente activa de una proteína marcadora puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud. Además, otras partes biológicamente activas, en las que otras regiones de la proteína marcadora están suprimidas, se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y evaluar para una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de la proteína marcadora. En determinadas realizaciones, las proteínas útiles son básicamente idénticas (por ejemplo, al menos aproximadamente un 40 %, y en determinadas realizaciones, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, o un 99 %) a una de estas secuencias y retienen la actividad funcional de la correspondiente proteína marcadora de origen natural pero difieren en la secuencia de aminoácidos debido a variaciones alélicas naturales o mutagénesis.

30 Además, se pueden usar bibliotecas de segmentos de una proteína marcadora para generar una población variegada de polipéptidos para identificación sistemática de una selección posterior de proteínas marcadoras variables o segmentos de las mismas.

### Medicina predictiva

35 En el presente documento también se proporcionan usos de los modelos y marcadores animales en el campo de la medicina predictiva en los que se usan ensayos de pronóstico, ensayos de pronóstico, farmacogenómica, y ensayos clínicos de monitorización clínica con fines de pronóstico (predictivos) para tratar de este modo a un individuo profilácticamente. Por consiguiente, en el presente documento también se proporcionan ensayos de pronóstico para determinar el nivel de expresión de una o más proteínas o ácidos nucleicos marcadores, para determinar si un individuo presenta el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Dichos ensayos se pueden usar con fines de pronóstico y predictivos para tratar de este modo profilácticamente a un individuo antes del inicio de la enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

45 En otro aspecto, los métodos son útiles para al menos identifica sistemáticamente de forma periódica al mismo individuo para observar si ese individuo ha estado expuesto a agentes químicos o toxinas que cambian sus patrones de expresión.

50 Además respecto pertenece al control de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos u otros compuestos administrados para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o para tratar o prevenir cualquier otro trastorno (por ejemplo, para comprender cualquier efecto en el sistema que puede tener dicho tratamiento) sobre la expresión o actividad de un marcador en ensayos clínicos.

### Farmacogenómica

55 Los marcadores también son útiles como marcadores farmacogenómicos. Tal como se usa en el presente documento, un "marcador farmacogenómico" es un marcador bioquímico objetivo cuyos niveles de expresión se correlacionan con una respuesta específica a fármacos clínicos o susceptibilidad en un paciente. La presencia o la cantidad de la expresión del marcador marcadores farmacogenómico están relacionadas con la respuesta predicha del paciente y más particularmente el tumor del paciente a la terapia con un fármaco o clase de fármacos específicos. Mediante la evaluación de la presencia o cantidad de la expresión de uno o más marcadores farmacogenómicos en un paciente, se puede seleccionar la terapia con fármacos que es más apropiada para el paciente, o que se predice que tiene un mayor grado de éxito.

### Ensayos clínicos de supervisión

La supervisión de la influencia de agentes (por ejemplo, compuestos fármaco) sobre el nivel de expresión de un marcador se puede aplicar no solamente en la identificación sistemática de fármacos básicos, sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente para afectar la expresión del marcador se puede supervisar en ensayos clínicos de sujetos que reciben tratamiento para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

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

Por ejemplo, la mayor expresión del gen o genes marcadores durante el ciclo del tratamiento puede indicar dosificación ineficaz y el deseo de aumentar la dosificación. De forma inversa, la expresión disminuida del gen o genes marcadores puede indicar tratamiento eficaz y ninguna necesidad de cambiar la dosificación.

### Medios, sistemas, matrices de lectura en dispositivos electrónicos y métodos de uso de los mismos

Tal como se usa en el presente documento, "medios de lectura en aparatos electrónicos" se refiere a cualquier medio adecuado para almacenar, mantener o contener datos o información que se puede leer y a la que se puede acceder directamente mediante un aparato electrónico. Dichos medios pueden incluir, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnético, tales como disquetes, en medio de almacenamiento en disco duro, y cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tales como discos compactos; medios de almacenamiento electrónico tales como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares; y discos duros en general e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnético/óptico. El medio está adaptado o configurado para tener registrado en el mismo un marcador tal como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aparato electrónico" pretende incluir cualquier aparato informático o de procesamiento adecuado u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Ejemplos de aparatos electrónicos adecuados para su uso con la presente invención incluyen aparatos informáticos autónomos; redes, que incluyen una red de área local (LAN), una red de Internet de área extendida (WAN), Intranet) y Extranet; aparatos electrónicos tales como asistentes digitales personales (PDA), teléfono móvil, buscaperonas y similares; y sistemas de procesamiento locales y distribuidos.

Tal como se usa en el presente documento, "grabado" se refiere a un proceso para almacenar o codificar información en el medio de lectura en dispositivos electrónico. Los expertos en la materia pueden adoptar fácilmente cualquier método para registrar información en medios para generar materiales que comprenden a los marcadores que se describen en el presente documento.

Diversos programas y formatos de software se pueden usar para almacenar la información del marcador de la presente invención en el medio de lectura en dispositivo electrónico. Se puede usar cualquier número de formatos que estructuran a los procesadores de datos (por ejemplo, archivo de texto o base de datos) para obtener o crear un medio que tiene registrado en el mismo a los marcadores. Al proporcionar los marcadores en forma de lectura, se puede acceder rutinariamente a la información de la secuencia del marcador para diversos fines. Por ejemplo, un experto en la materia puede usar las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos en forma de lectura para comparar una secuencia diana o motivo estructural diana con la información de la secuencia almacenada dentro de los medios de almacenamiento de datos. Se usan medios de búsqueda para identificar fragmentos o regiones de las secuencias que se emparejan con una secuencia diana o motivo diana en particular.

Por lo tanto, en el presente documento también se proporciona un medio para contener instrucciones para realizar un método para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon asociada con una predisposición a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que el método comprende las etapas de determinar la presencia o ausencia de un marcador y basándose en la presencia o ausencia del marcador, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon y/o recomendar un tratamiento en particular para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o afección previa a la enfermedad relacionada con el 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 el cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon asociada 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 el cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, y/o recomendar un tratamiento en particular para la enfermedad relacionada con el cáncer de colon o afección previa a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon. El método puede comprender adicionalmente la etapa de recibir información fenotípica asociada con el sujeto y/o adquirir a partir 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 el cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon asociada con un marcador, método que comprende las etapas de recibir información asociada con el marcador, recibir información fenotípica asociada con el sujeto, adquirir información de la red que corresponde al marcador y/o a enfermedad relacionada con el cáncer de colon, y basándose en una o más de las informaciones fenotípicas, el marcador, y la información adquirida, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. El método puede comprender adicionalmente la etapa de recomendar un tratamiento en particular para la enfermedad relacionada con el cáncer de colon o afección previa a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

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

En el presente documento también se proporciona una matriz que puede usar para someter a ensayo la expresión de uno o más genes en la matriz. En una realización, la matriz se puede usar para someter a ensayo la expresión genética en un tejido para determinar la especificidad tisular de genes en la matriz. De esta forma, hasta aproximadamente 7000 o más genes se puede someter a ensayo simultáneamente para la expresión. Esto permite que se desarrolle un perfil que muestra 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 genética. Por lo tanto, se puede determinar no solamente la especificidad del tejido, sino también el nivel de expresión de una batería de genes en el tejido. Por lo tanto, los genes se pueden agrupar basándose en su expresión tisular en sí misma y el nivel de expresión en ese tejido. Es útil, por ejemplo, en la verificación de la relación de la expresión genética entre dos o varios tejidos. Por lo tanto, un tejido se puede perturbar y se puede determinar el efecto sobre la expresión genética en un segundo tejido. En este contexto, se puede determinar 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 al nivel de expresión genética. Si un agente se administra terapéuticamente para tratar un tipo celular pero tiene un efecto no deseado sobre otro tipo celular, el método proporciona un ensayo para determinar la base molecular del efecto no deseado y de este modo proporciona la oportunidad de coadministrar un agente para contrarrestar o tratar de otro modo el efecto no deseado. De forma análoga, incluso dentro de un solo tipo celular, los efectos biológicos no deseados se pueden determinar al nivel molecular. Por lo tanto, se pueden determinar y contrarrestar los efectos de un agente sobre la expresión de otros que no sean el gen diana.

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

La matriz tamil 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 intervención terapéutica si la diana final o corriente abajo no se puede regular.

La matriz también es útil para determinar los patrones de expresión diferencial de uno o más genes en células normales y anómalas. Esto proporciona una batería de genes que podría servir como diana molecular para pronóstico o intervención terapéutica.

### Marcadores de sustitución

Los marcadores pueden servir como marcadores de sustitución para uno o más trastornos o estados de enfermedad o para afecciones que llevan a un estado de enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Tal como se usa en el presente documento, un "marcador de sustitución" es un marcador bioquímico objetivo que se correlaciona con la ausencia o presencia de una enfermedad o trastorno, o con la progresión de una enfermedad o trastorno. La presencia o cantidad de dichos marcadores es independiente de la enfermedad. Por lo tanto, estos marcadores pueden servir para indicar si un ciclo de tratamiento en particular es eficaz para disminuir un estado de enfermedad o trastorno. Los marcadores de sustitución son de uso en particular cuando la presencia o extensión de un estado de enfermedad o trastorno es difícil de evaluar a través de metodologías convencionales, o cuando se desea una evaluación de la progresión de la enfermedad antes de que se alcancen un punto final clínico potencialmente peligroso.

Los marcadores también son útiles como marcadores farmacodinámicos. Tal como se usa en el presente documento, un "marcador farmacodinámico" es un marcador bioquímico objetivo que se correlaciona específicamente con efectos de fármacos. La presencia o cantidad de un marcador farmacodinámico no está relacionada con el estado de enfermedad o trastorno para el que se está administrando 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, en el que el marcador se expresa o se transcribe o no se expresa ni se transcribe en ese tejido con relación al nivel del fármaco. De este modo, la distribución o absorción del fármaco se puede supervisar mediante el marcador farmacodinámico. De forma análoga, la presencia o cantidad del marcador farmacodinámico se puede relacionar con la presencia o cantidad del producto metabólico de un fármaco, del mismo modo que la presencia o cantidad del marcador es indicativo de la velocidad de descomposición relativa del fármaco *in vivo*.

Los marcadores farmacodinámicos son de uso en particular para aumentar la sensibilidad de la detección de los efectos de fármacos, particularmente cuando el fármaco se administra en dosis bajas. Dado que incluso una pequeña cantidad de un fármaco puede ser suficiente para activar varias rondas de transcripción o expresión de marcadores, el marcador amplificado puede estar en una cantidad que se puede detectar más fácilmente que el fármaco en sí mismo. Además, el marcador se puede detectar más fácilmente debido a la naturaleza del marcador en sí mismo; por ejemplo, usando los métodos que se describen en el presente documento, los anticuerpos se pueden usar en un sistema de detección basado en el sistema inmunológico para un marcador de proteínas, o se pueden usar sondas radio marcadas específicas de marcadores para detectar un marcador de mRNA. Además, el uso de un marcador farmacodinámico puede ofrecer predicción de riesgos basada en mecanismos debido al tratamiento con fármacos más allá del intervalo de observaciones directas posibles.

### Protocolos para ensayo

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

Cuando el gen marcador es uno de los genes que se describen en el presente documento y el nivel de expresión se expresa diferencialmente (por ejemplo, más elevado o más bajo que el del control), se considera que el sujeto está afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Cuando el nivel de expresión del gen marcador entra dentro del intervalo permisible, es improbable que el sujeto esté afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

El valor estándar para el control se puede determinar previamente mediante la medida del nivel de expresión del gen marcador en el control, para comparar los niveles de expresión. Por ejemplo, el valor estándar se puede determinar basándose en el nivel de expresión del gen marcador que se ha mencionado anteriormente en el control. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el intervalo permisible se toma como  $\pm 2S.D.$  basándose en el valor estándar. Una vez que se determina el valor estándar, el método de ensayo se puede realizar midiendo solamente el nivel de expresión en una muestra biológica a partir de un sujeto y comparando el valor con el valor estándar determinado para el control.

Los niveles de expresión de genes marcadores incluyen transcripción de los genes marcadores en ARN, y traducción en proteínas. Por lo tanto, un método de ensayo de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se realiza basándose en una comparación de la intensidad de la expresión del ARN que corresponde con los genes marcadores, o el nivel de expresión de proteínas codificadas por los genes marcadores.

La medida de los niveles de expresión de genes marcadores en el ensayo de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se puede realizar de acuerdo con diversos métodos de análisis génico. Específicamente, se puede usar, por ejemplo, una técnica de hibridación que usa ácidos nucleicos que hibridan a estos genes como sondas, o una técnica de amplificación genética que usa ADN para hibridar los genes marcadores como cebadores.

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

5 Además, se debe entender que los genes de animales superiores generalmente van acompañados de polimorfismo con una alta frecuencia. Además existen muchas moléculas que producen isoformas que comprenden secuencias de aminoácidos diferentes mutuamente durante el proceso de empalme. Cualquier gen asociado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon que tiene una actividad similar a la de un gen marcador está incluido en los genes marcadores, incluso si tiene diferencias en la secuencia de nucleótidos debido a polimorfismo o porque es una isoforma.

10 También se debe entender que los genes marcadores pueden incluir homólogos de otras especies además de seres humanos. Por lo tanto, a menos que se indique de otro modo, la expresión "gen marcador" se refiere a un homólogo del gen marcador único para las especies o un gen marcador extraño que se ha introducido en un individuo.

15 Además, se debe entender que un "como logo de un gen marcador" se refiere a un gen derivado de una especie distinta a un ser humano, que puede hibridar en el gen marcador humano como una sonda en condiciones estrictas. Dichas condiciones estrictas las conoce un experto en la materia que puede seleccionar una condición apropiada para producir o produce experimentalmente un entéricamente un rigor semejante.

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

25 Además, "complementario" se refiere no solamente a los que son totalmente complementarios con una región de al menos 15 nucleótidos continuos, sino también a los que tienen una homología con la secuencia de nucleótidos de al menos un 40 % en determinados casos, un 50 % en determinados casos, un 60 % en determinados casos, un 70 % en determinados casos, al menos un 80 %, un 90%, y un 95 % o superior. El grado de homología entre secuencias de nucleótidos se puede determinar mediante un algoritmo, BLAST, etc.

30 Dichos polinucleótidos son útiles como una sonda para detectar un gen marcador, o como cebador para amplificar un gen marcador. Cuando se usa como cebador, el polinucleótido comprende habitualmente de 15 bp a 100 bp, y en determinadas realizaciones de 15 bp a 35 bp of nucleótidos. Cuando se usa como una sonda, un ADN comprende toda la secuencia de nucleótidos del gen marcador (o la hebra complementaria del mismo), o una secuencia parcial del mismo que tiene al menos 15 bp nucleótidos. Cuando se usa como cebador, la región 3' debe ser complementaria con el gen marcador, mientras que la región 5' puede estar unida a una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción o a una marca.

35 Los "polinucleótidos" pueden ser ADN o ARN. Estos polinucleótidos pueden ser sintéticos o de origen natural. Además, el ADN usado como una sonda para hibridación normalmente está marcado. Los expertos en la materia entienden fácilmente dichos métodos de marcado. En el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido con un grado relativamente bajo de polimerización. Los oligonucleótidos están incluidos en los polinucleótidos.

40 Ensayos para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon que usan técnicas de hibridación se pueden realizar usando, por ejemplo, hibridación Northern, hibridación dot blot (de mancha de puntos), o la técnica de micromatrices de ADN. Además, se pueden usar técnicas de amplificación genética, tales como el método de RT-PCR. Mediante el uso del método de supervisión de la amplificación genética por PCR durante la etapa de amplificación genética gene en RT-PCR, se puede conseguir un análisis más cuantitativo de la expresión de un gen marcador.

45 En el método de supervisión de la amplificación genética por PCR, la diana de detección (ADN o transcripción inversa de ARN) se hibridar a sondas que están marcadas con un tinte fluorescente y un inactivador que absorbe la fluorescencia. Cuando la PCR avanza y la Taq polimerasa de cada la sonda con su actividad exonucleasa en la posición 5'-3', el tinte fluorescente del inactivador se alejan entre sí y se detecta la fluorescencia. La fluorescencia se detecta en tiempo real. Mediante la medida simultánea de una muestra convencional en la que se conoce el número de copias de la diana, es posible determinar el número de copias de la diana en la muestra del sujeto con el número de ciclos en los que la amplificación de PCR es lineal. Además, un experto en la materia reconoce que el método de supervisión de la amplificación por PCR se puede realizar usando cualquier método adecuado.

50 El método para someter a ensayo una enfermedad relacionada con el cáncer de colon también se puede realizar mediante la detección de la 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, se pueden usar el método de Western blot (mancha de transferencia), el método de

inmunoprecipitación, y el método de ELISA usando un anticuerpo que se une con cada proteína marcadora.

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

Una proteína o un péptido parcial de la misma usado como un antígeno se puede obtener, por ejemplo, mediante la inserción de un gen marcador o una parte del mismo en un vector de expresión, introduciendo el constructo en una célula huésped apropiada para producir un transformante, cultivar el transformante para expresar la proteína recombinante, y purificar la proteína recombinante expresada a partir del cultivo o el sobrenadante del cultivo. Como alternativa, la secuencia de aminoácidos codificada por un gen o un oligopéptido que comprende una parte de la secuencia de aminoácidos codificada por un cADN de longitud total se sintetizan químicamente para usarlos como un inmunógeno.

Además, se puede realizar un ensayo para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon usando como un índice no solamente el nivel de expresión de un gen marcador sino también la actividad de una proteína marcadora en una muestra biológica. La actividad de una proteína marcadora hace referencia a la actividad biológica intrínseca a la proteína. Se pueden usar diversos métodos para medir la actividad de cada proteína.

Incluso si no se ha diagnosticado que un paciente está afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un ensayo de rutina a pesar de los síntomas que sugieren estas enfermedades, tanto si el paciente está padeciendo o no una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, se puede determinar fácilmente realizando un ensayo de acuerdo con los métodos que se describen en el presente documento.

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

Además, los ensayos son útiles para determinar si una enfermedad relacionada con el cáncer de colon está mejorando en un paciente. En otras palabras, los métodos que se describen en el presente documento se pueden usar para juzgar el efecto terapéutico de un tratamiento para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Además, cuando el gen marcador es uno de los genes que se describen en el presente documento, un aumento o una disminución en el nivel de expresión del gen marcador en un paciente, que ha sido diagnosticado como que está afectado con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, implica que la enfermedad ha avanzado más.

La gravedad y/o susceptibilidad a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon también se puede determinar basándose en la diferencia en los niveles expresión. Por ejemplo, cuando el gen marcador es uno de los genes que se describen 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 el cáncer de colon.

### Modelos animales

En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan modelos animales para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en los que el nivel de expresión de uno o más genes marcadores o de un gen funcionalmente equivalente al gen marcador ha sido elevado en el modelo animal. Un "gen funcionalmente equivalente" tal 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 al animal.

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

En una realización, un modelo animal para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se puede crear mediante el control del nivel de expresión de un gen homólogo o mediante la administración de un gen homólogo. El método puede incluir crear un modelo animal para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon mediante el control del nivel de expresión de un gen seleccionado entre el grupo de genes que se describen en el presente documento. En otra realización, el método puede incluir crear un modelo animal para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon mediante la administración de la proteína codificada por un gen que se describe en el presente documento, o mediante la administración de un anticuerpo contra la proteína. También se debe entender, que en otras determinadas realizaciones, el marcador se puede sobre expresar de modo que el marcador se puede

medir a continuación usando métodos apropiados.

En otra realización, un modelo animal para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se puede crear mediante la introducción de un gen seleccionado entre dichos grupos de genes, o mediante la administración de la proteína codificada por dicho gen.

En otra realización, una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se puede inducir mediante la supresión de la expresión de un gen seleccionado entre dichos grupos de genes con la actividad de una proteína codificada por dicho gen. Un ácido nucleico antisentido, un ribozima, o un ARNi se pueden usar para suprimir la expresión. La actividad de una proteína se puede controlar de forma eficaz mediante la administración de una sustancia que inhibe la actividad, tal como un anticuerpo.

El modelo animal es útil para elucidar el mecanismo subyacente a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon y además someter a ensayo la seguridad de los compuestos obtenidos mediante identificación sistemática. Por ejemplo, cuando un modelo animal desarrollado síntomas de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon, o cuando un valor medido implicado en una determinada enfermedad relacionada con el cáncer de colon se altera en el animal, se puede construir un sistema de identificación sistemática para explorar compuestos que tienen actividad para aliviar la enfermedad.

Tal 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 extraño se expresa artificialmente; cuando la transcripción de un gen marcador intrínseco al sujeto animal y la traducción del mismo en la proteína están aumentadas; o cuando la hidrólisis de la proteína, que es el producto de la traducción, está suprimida. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "una disminución en el nivel de expresión" se refiere al estado en el que la transcripción de un gen marcador del sujeto animal y la traducción del mismo una proteína están inhibidas, o el estado en el que la hidrólisis de la proteína, que es el producto de la traducción, está aumentado. El nivel de expresión de un gen se puede determinar, por ejemplo, mediante una diferencia en la intensidad de la señal en un chip de ADN. Además, la actividad del producto-la proteína- de traducción se puede determinar mediante la comparación de ésta en el estado normal.

También está dentro del alcance contemplado que el modelo animal puede incluir animales transgénicos, que incluyen, por ejemplo animales en los que se ha introducido un gen marcador y se ha expresado artificialmente; animales knockout (genes inactivados) del gen marcador; y animales knock-in (genes bloqueadores) en los que otro gen sea sustituido con un gen marcador. 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 funciona como un ácido nucleico señuelo o similar, se pueden usar como animal transgénico. Dichos animales transgénicos también incluyen, por ejemplo, animales en los que la actividad de una proteína marcadora ha sido aumentada o suprimida mediante la introducción de una mutación o mutaciones en la región de codificación del gen, o la secuencia de aminoácidos ha sido modificada para hacerse resistente o susceptible a la hidrólisis. Mutaciones en una secuencia de aminoácidos incluyen sustituciones, supresiones, inserciones, y adiciones.

Además, la expresión en sí misma de un gen marcador se puede controlar mediante la introducción de una mutación o mutaciones en la región reguladora de la transcripción del gen. Los expertos en la materia comprenden dichas sustituciones de aminoácidos. Además, el número de aminoácidos que están mutados no está restringido particularmente, siempre que se mantenga la actividad. Normalmente, está dentro de 50 aminoácidos, en determinadas realizaciones son limitantes, dentro de 30 aminoácidos, dentro de 10 aminoácidos, o dentro de 3 aminoácidos. El sitio de mutación puede ser cualquier sitio, siempre que se mantenga la actividad.

En otro aspecto más, en el presente documento se proporcionan métodos de identificación sistemática para compuestos candidatos como agentes terapéuticos para tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Uno o más genes marcadores se seleccionan entre el grupo de genes que se describen en el presente documento. Un agente terapéutico para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se puede obtener mediante la selección de un compuesto capaz de aumentar o disminuir el nivel de expresión del gen o genes marcadores.

Se debe observar que la expresión "un compuesto que aumenta el nivel de expresión de un gen" se refiere a un compuesto que promueve una cualquiera de las etapas de transcripción genética, traducción genética, o expresión de una actividad de proteína. Por otro lado, la expresión "un compuesto que disminuye el nivel de expresión de un gen", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que inhibe una cualquiera de estas etapas.

En aspectos en particular, el método para la identificación sistemática de un agente terapéutico para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se puede realizar in vivo o in vitro. Este método de identificación sistemática se puede realizar, por ejemplo, mediante la (1) administración de un compuesto candidato a un sujeto animal; (2) medir el nivel de expresión de un gen o genes marcadores en una muestra biológica a partir del sujeto animal; o (3) seleccionar un compuesto que aumenta o disminuye el nivel de expresión de un gen o genes marcadores en comparación con ese en un control con el que el compuesto candidato no se ha puesto en contacto.

Además en otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para evaluar la eficacia de un compuesto candidato para un agente terapéutico en el nivel de expresión de un gen o genes marcadores poniendo en contacto un sujeto animal con el compuesto candidato y supervisando el efecto del compuesto en el nivel de expresión del gen o genes marcadores en una muestra biológica derivada del sujeto animal. La variación en el nivel de expresión del gen o genes marcadores en una muestra biológica derivada del sujeto animal se puede supervisar usando la misma técnica tal como se usa en el método de ensayo que se ha descrito anteriormente. Además, basándose en la evaluación, un compuesto candidato para un agente farmacéutico se puede seleccionar mediante identificación sistemática.

Todas las patentes, solicitudes de patentes y referencias citadas en el presente documento se incorporan en su totalidad por referencia. Mientras que la invención se ha descrito y realizado a modo de ejemplo con suficiente detalle para los expertos en esta materia para realizarla y usarla, diversas alternativas, modificaciones y mejoras deberían ser evidentes sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención. Un experto en la materia observa fácilmente que la presente invención está bien adaptada para realizar los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los que son inherentes a la misma.

Los métodos y reactivos que se describen en el presente documento son representativos de realizaciones preferentes, son a modo de ejemplo, y no se pretende que sean limitaciones del alcance de la invención. Modificaciones en ella y otros usos se les ocurrirán a los expertos en la materia. Estas modificaciones están incluidas dentro del espíritu de la invención y están definidas por el alcance de las reivindicaciones. También será rápidamente evidente para una persona experta en la materia que se pueden hacer sustituciones y modificaciones variables a la invención que se desvela en el presente documento sin apartarse del alcance y el espíritu de la invención.

## 25 **REFERENCIAS PARA EL EJEMPLO 1**

1. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, y col. Carcinoma of the colon and rectum. En: 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 Clin 2007; 57 (1);43-66.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61 (5): 759-67.
4. Goldman E, Fisher JL. Discrepancies in cancer mortality estimates. Arch Med Res 2006; 37 (4): 548-51.
5. Rodriguez-Bigas MA, HoffP, Crane CH. Carcinoma of the Colon and Rectum. En: Kufe DW, Bast RC, Hait WN, y col., eds. Holland-Frei Cancer Medicine 7, 7ª 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); 857-66.
7. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, y col. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2005; 353 (17): 1793-801.
8. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, y col. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 2006; 9 (3): 189-98.
9. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116 (2): 281-97.
10. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14, Cell 1993; 75 (5), 843-54.
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, y col. A microRNA policistron 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, y col. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005; 435 (7043): 834-8.
19. Volinia S, Calin GA, Liu CG, y col. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103 (7): 2257-61.
20. Cummins JM, He Y, Leary RJ, y col. The colorectal microRNAome. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103 (10): 3687-92.
21. Bandres E, Cubed E, Agirre X, y col. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNA differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. Mol Cancer 2006; 5:29.

22. Michael MZ, SM OC, van Hoist Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific micro-RNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1 (12): 882-91.
23. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, y col. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (24): 15524-9.
- 5 24. Dews M, Homayouni A, Yu D, y col. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 2006; 38 (9): 1060-5.
25. Wang CL, Wang BB, Bartha G, y col. Activation of an oncogenic microRNA cluster by provirus integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103 (49): 18680-4.
- 10 26. Georgantas RW, 3rd, Hildreth R, Morisot S, y col. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (8): 2750-5.
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.
- 15 29. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, y col. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438 (7068): 685-9.
30. Liu CG, Calin GA, Meloon B, y col. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 (26): 9740-4.
31. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2005; 48 (6): 11618.
- 20 32. Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 2004; 339 (2)-327-35.
33. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, y col. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65 (21): 962832.
34. Iorio MV, Ferracin M, Litt CG, y col. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65 (16): 7065-70.
- 25 35. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007; 26 (19): 2799-803.
36. Meng F, Henson R Lang M, y col. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130 (7): 2113-29.
37. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 Targets the Tumor Suppressor Gene Tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007; 282 (19): 14328-36.
- 30 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 of microRNA by antagomirs: a new class of pharmacological antagonists for the specific regulation of gene function? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36 (1): 8-12.
- 35

## **REFERENCIAS PARA EL EJEMPLO 2**

1. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2006.
2. Bartel, D. P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116 (2): p. 281-97.
- 40 3. Esquela-Kerscher, A. y F.J. Slack, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6 (4): p. 259-69.
4. Brennecke, J., D.R. Hipfner, A. Stark, R.B. Russell, y S.M. Cohen, bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 2003, 113 (1): p. 25-36.
- 45 5. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, y K.S. Kosik, MicroRNAs-21 is an antiapoptotic, factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 2005, 65 (14): p. 6029-33.
6. Xu, P., S.Y. Vernooy, M. Guo, y B.A. Hay, The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal/at metabolism. *Curr Biol*, 2003, 13 (9): p. 790-5.
7. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, y V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 1993, 75 (5): p. 843-54.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 12. Volinia, S., G.A. Calin, C.G. Liu, S. Arabs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R.L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C.C. Harris, y C.M. Croce, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (7): p. 2257-61.
- 65 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. Volculescu,

- 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.
- 5 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.
- 10 16. Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K.G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, y M. Stoffel, Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 2005, 438 (7068): p. 685-9.
17. Liu, C.G., G.A. Calin, B. 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.
- 15 18. Iorio, M.V., M. Ferracin, C.G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J.P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G.A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, y C.M. Croce, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65 (16): p. 7065-70.
19. Cheng, A.M., M.W. Byrom, J. Shelton, y L.P. Ford, Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNAi cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33 (4): p. 1290-7.
- 20 20. Tanzer, A. y P.F. Stadler, Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol*, 2004, 339 (2): p. 327-35.

**REIVINDICACIONES**

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

5           medir el nivel de al menos un producto génico de miR-181b en una muestra de ensayo del sujeto en donde dicho sujeto tiene adenocarcinoma de colon, en el que un aumento en al menos el nivel del producto génico de miR-181b en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico de miR-181b correspondiente en una muestra de control, es indicativo de que el sujeto tiene adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia.

2. Un método para someter a ensayo un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia, que comprende:

15       (1) determinar un nivel de expresión de al menos un marcador en una muestra de un sujeto de ensayo que tiene adenocarcinoma de colon; incluyendo el al menos un marcador al menos un producto génico de miR-181b;  
 (2) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa (1) con un nivel de expresión de control del marcador en una muestra de un sujeto sano; y  
 (3) considerar que el sujeto tiene un adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia cuando el resultado de la comparación en la etapa (2) indica que:

          el nivel de expresión del al menos un marcador en el sujeto de ensayo es mayor que 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, suelo, 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 el sujeto tiene adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia, que comprende:

35       (1) transcribir inversamente el ARN a partir 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 a una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miR-181b 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 de control,

40       en el que un aumento en la señal del miR-181b es indicativo de que el sujeto tiene adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia.

6. El método de la reivindicación 1, en el que un nivel de expresión de producto génico de miR-181b se evalúa mediante la detección de la presencia de un polinucleótido transcrito o parte del mismo, en el que el polinucleótido transcrito comprende una región de codificación de producto génico de miR-181b.

7. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra es un fluido o tejido corporal asociado con el 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 de miR-181b incluye variantes aisladas o fragmentos biológicamente activos de las mismas.

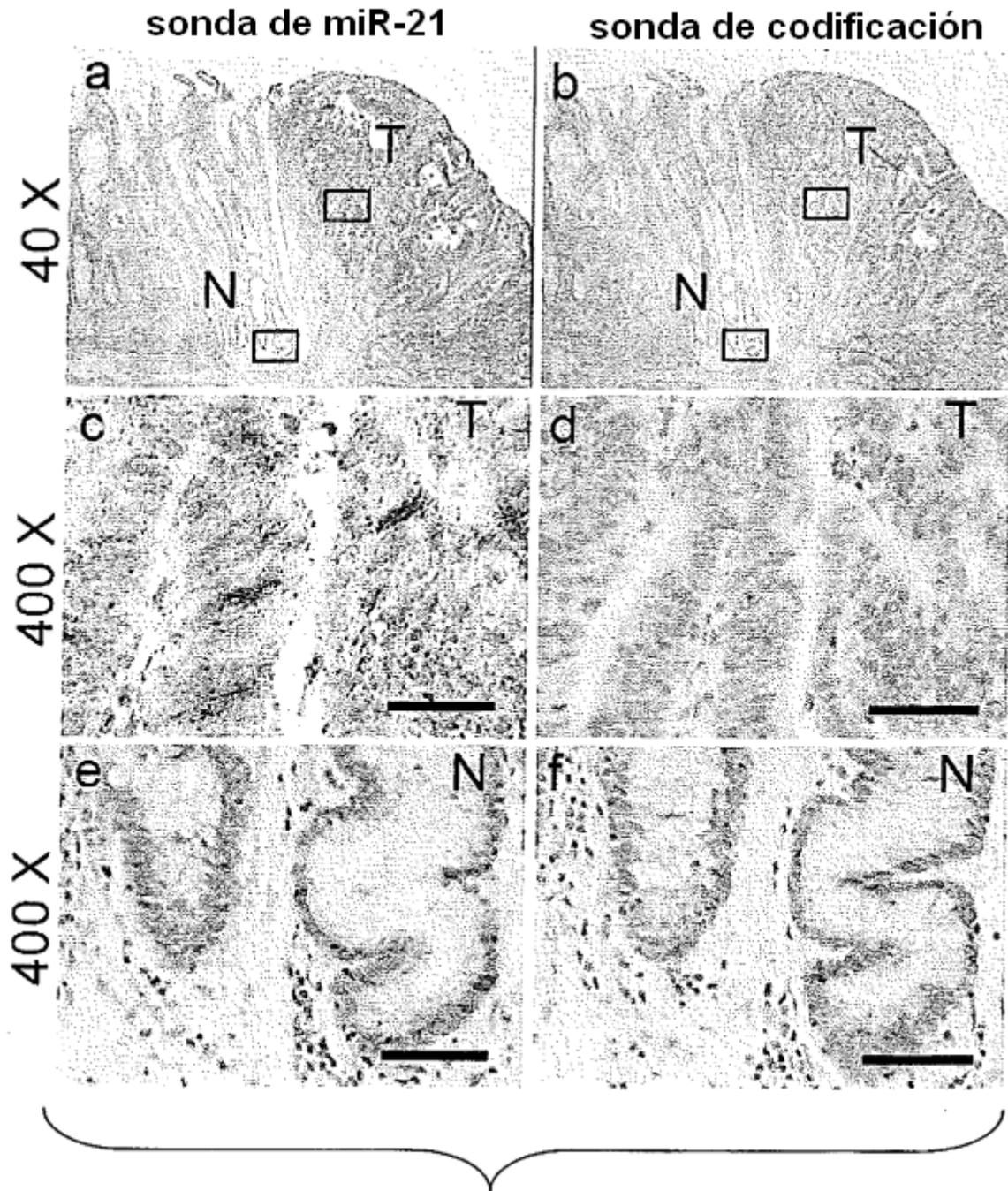
10. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos un producto génico de miR adicional en la muestra de ensayo, en el que el miR está seleccionado entre el grupo que consiste en: miR-21; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.

11. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos dos o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR están seleccionados entre el grupo que consiste en: miR-21; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.

12. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos tres o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR están seleccionados entre el grupo que consiste en: miR-21; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.

65

13. El método de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos un producto génico de miR adicional en la muestra de ensayo, en el que el miR está seleccionado entre el grupo que consiste en: miR-21; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.
- 5 14. El método de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos dos o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR están seleccionados entre el grupo que consiste en: miR-21; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.
- 10 15. El método de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos tres o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR están seleccionados entre el grupo que consiste en: miR-21; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.
- 15 16. El método de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos un producto génico de miR adicional en la muestra de ensayo, en el que el miR está seleccionado entre el grupo que consiste en: miR-21; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.
- 20 17. El método de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos dos o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR están seleccionados entre el grupo que consiste en: miR-21; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.
18. El método de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos tres o más productos génicos de miR adicionales en la muestra de ensayo, en el que los miR están seleccionados entre el grupo que consiste en: miR-21; let-7g; miR-16b; miR-106a; miR-103-2; miR-203; miR-29a; y miR-10a.



Figuras 1a - 1f

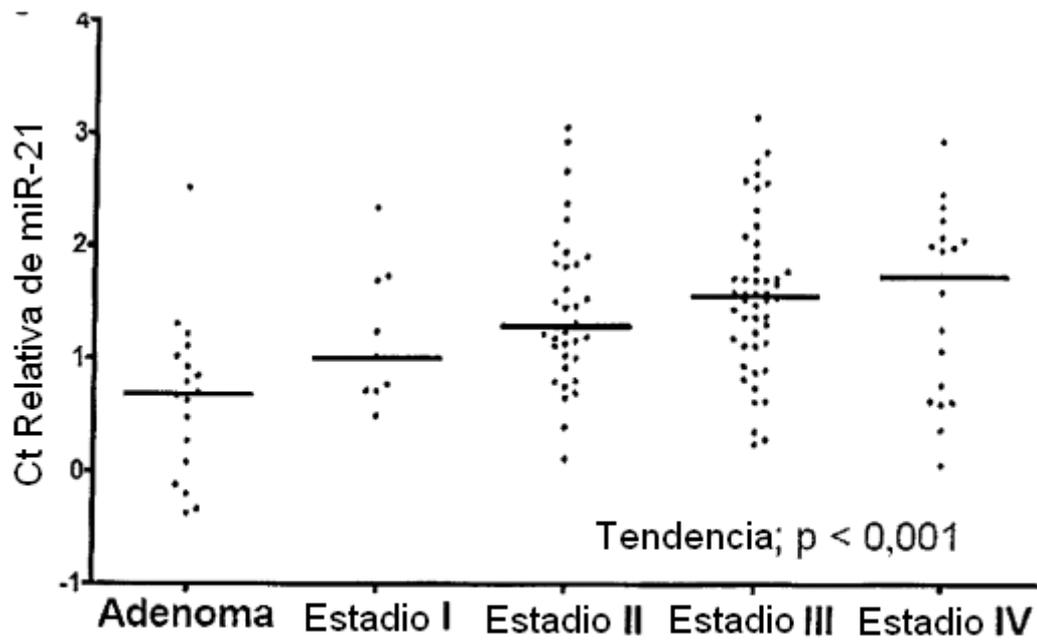


Figura 1g

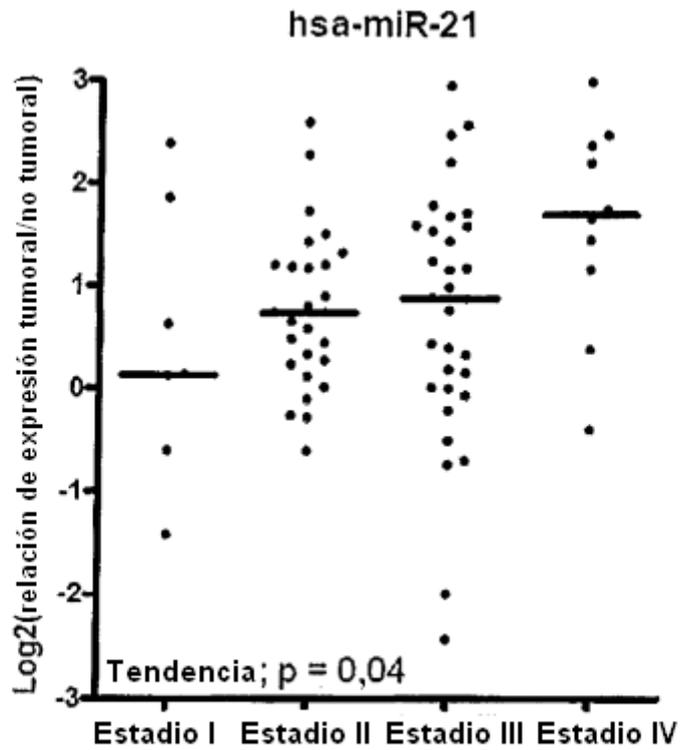


Figura 2

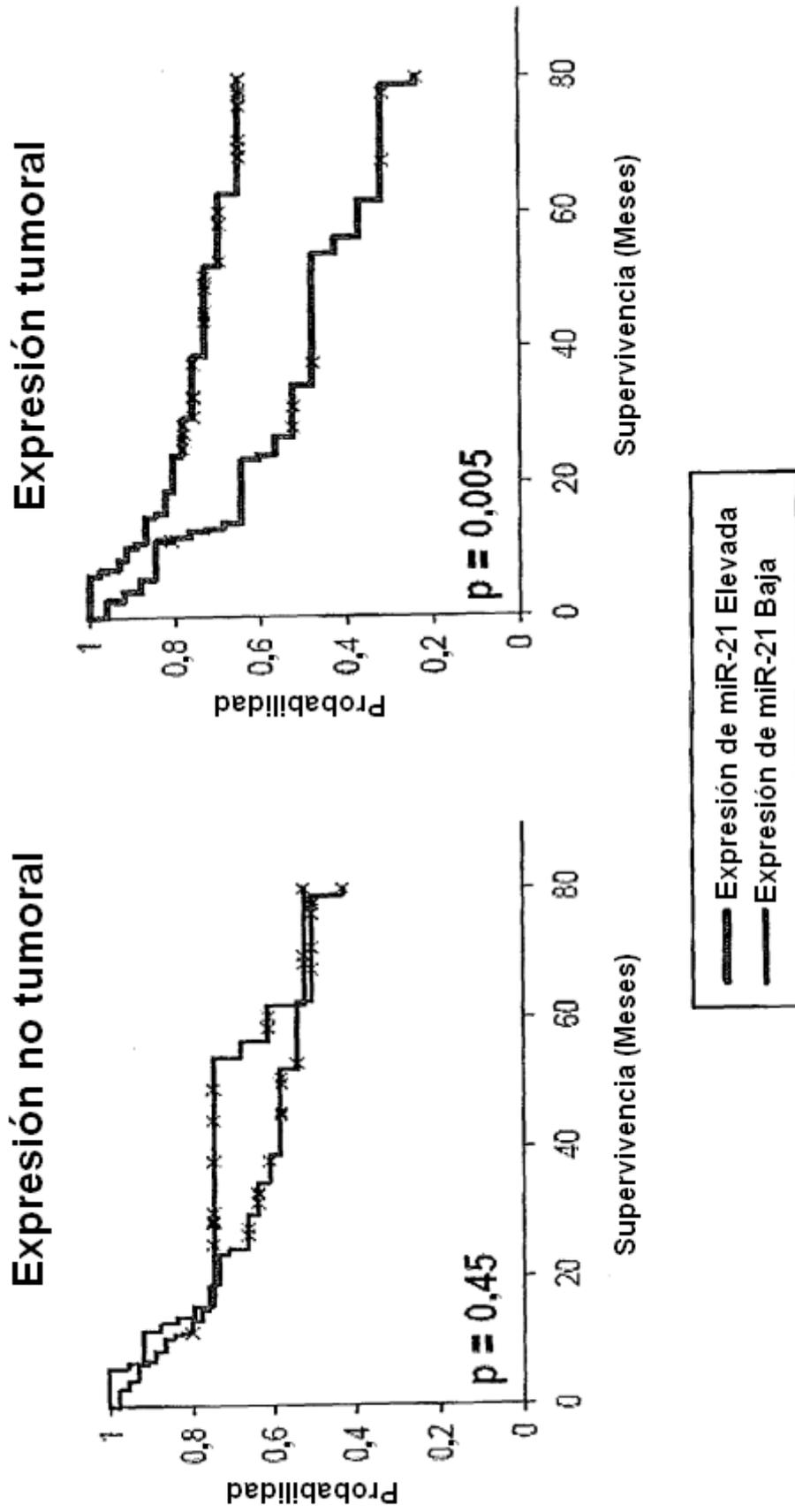


Figura 3a

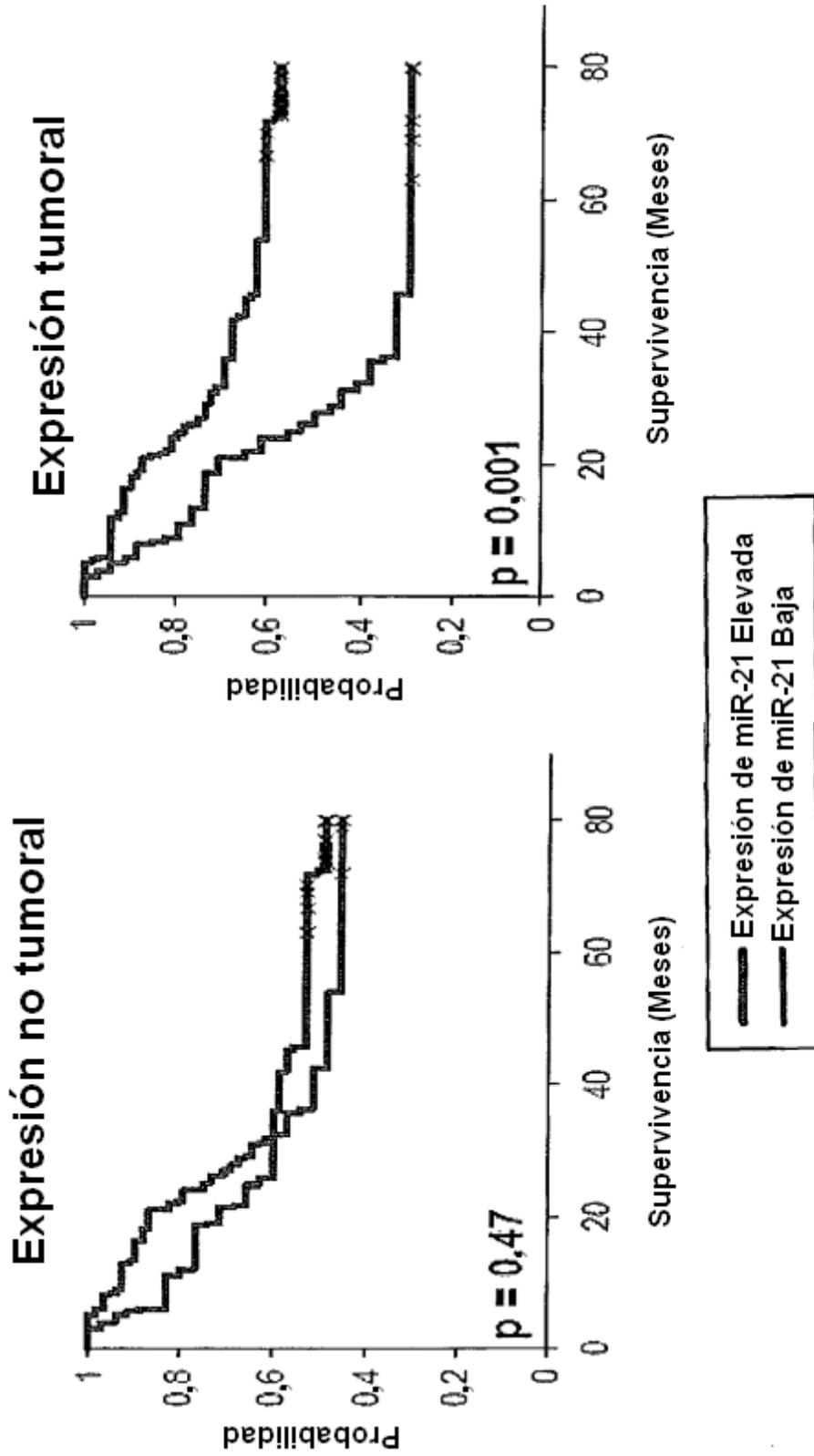


Figura 3b

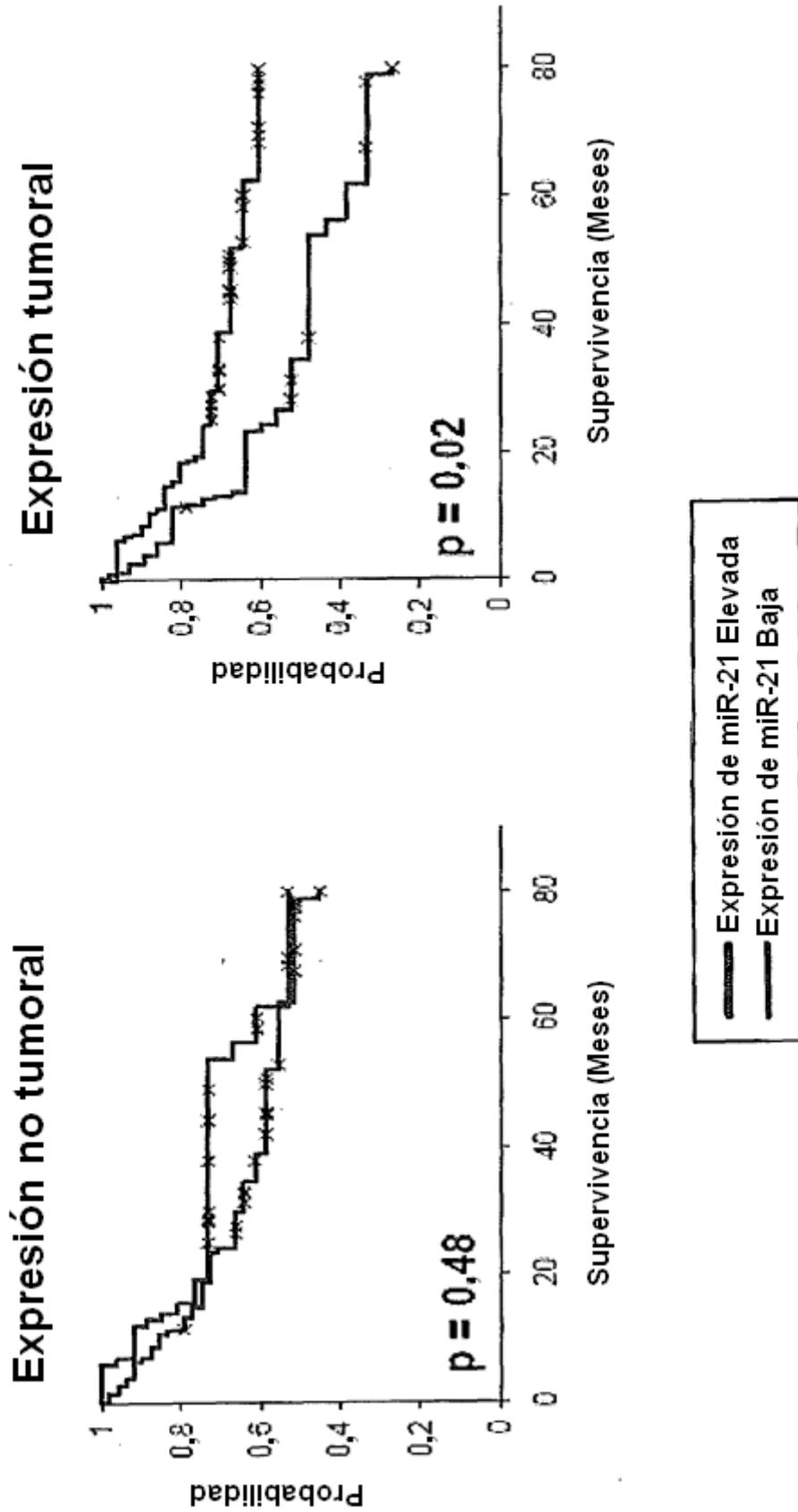


Figura 4a

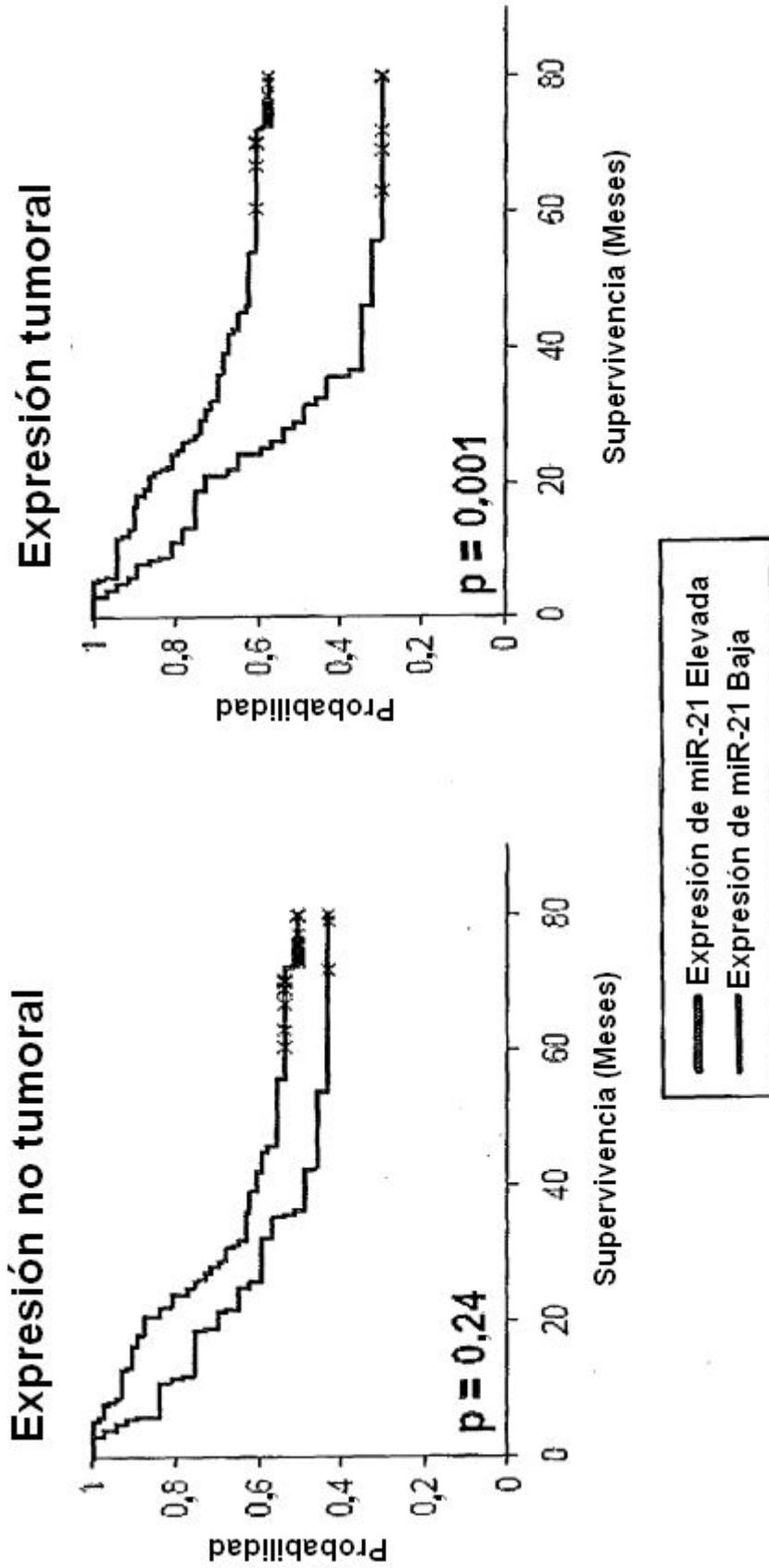
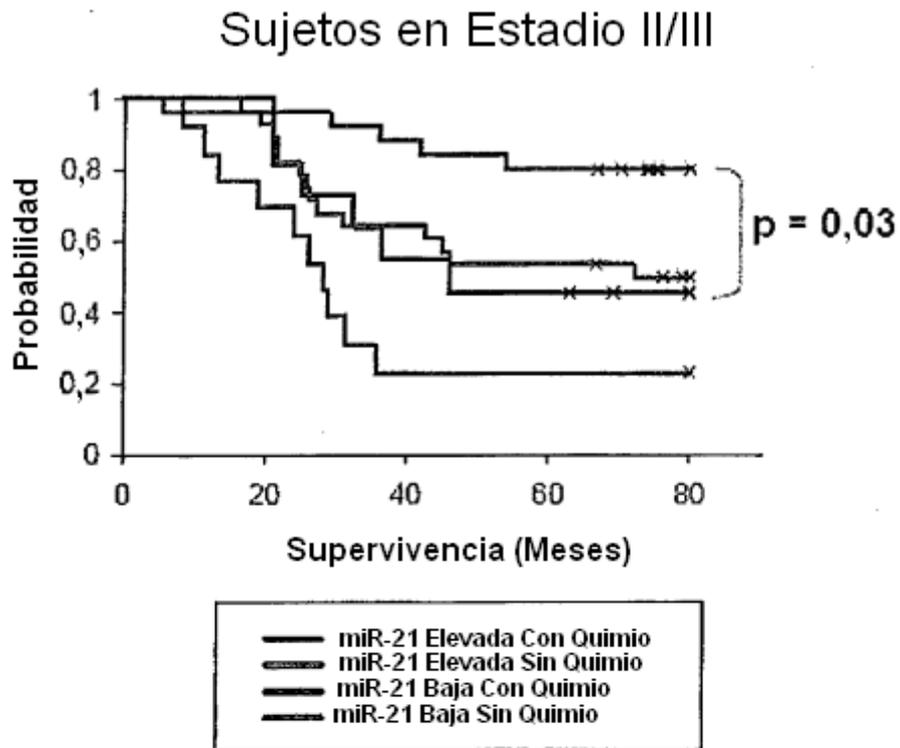
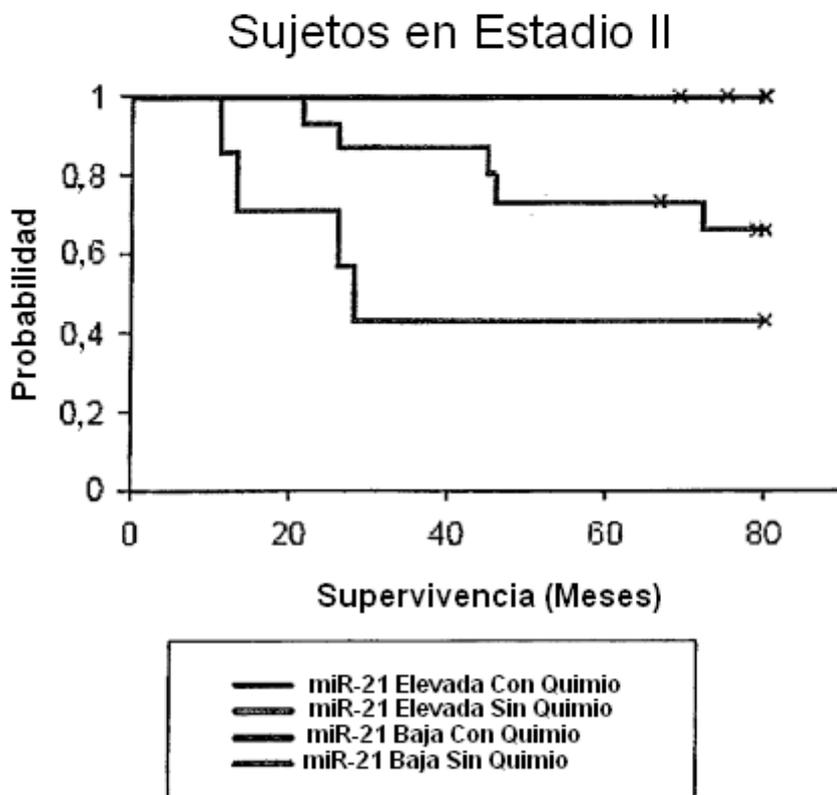


Figura 4b



**Figura 5a**



**Figura 5b**

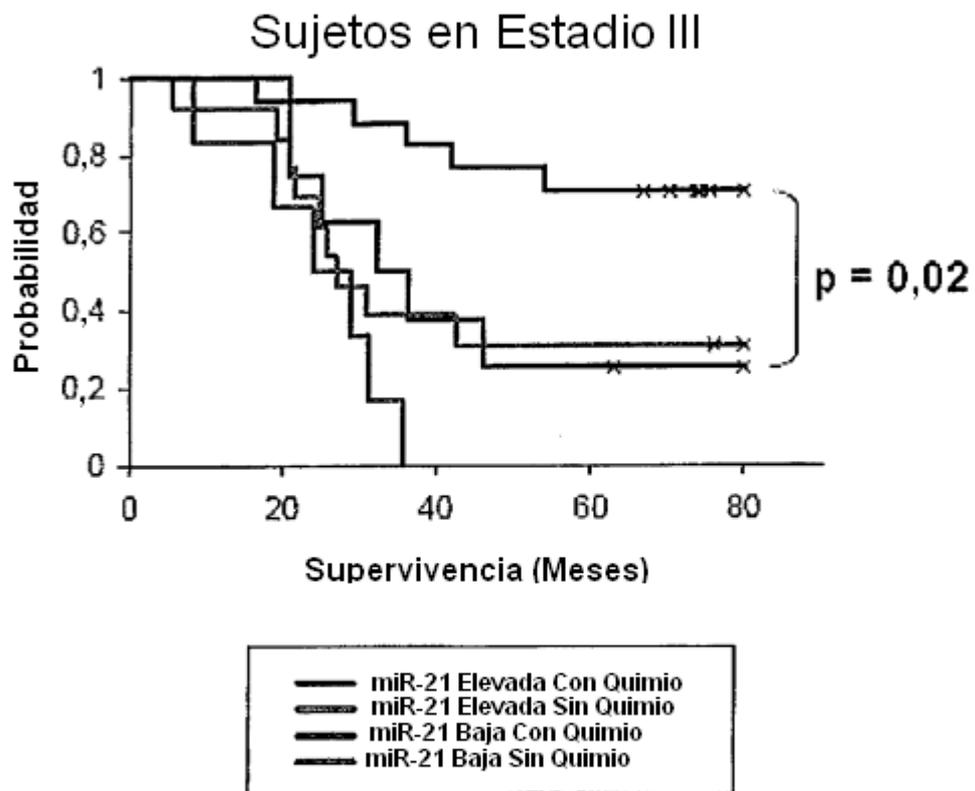


Figura 5c

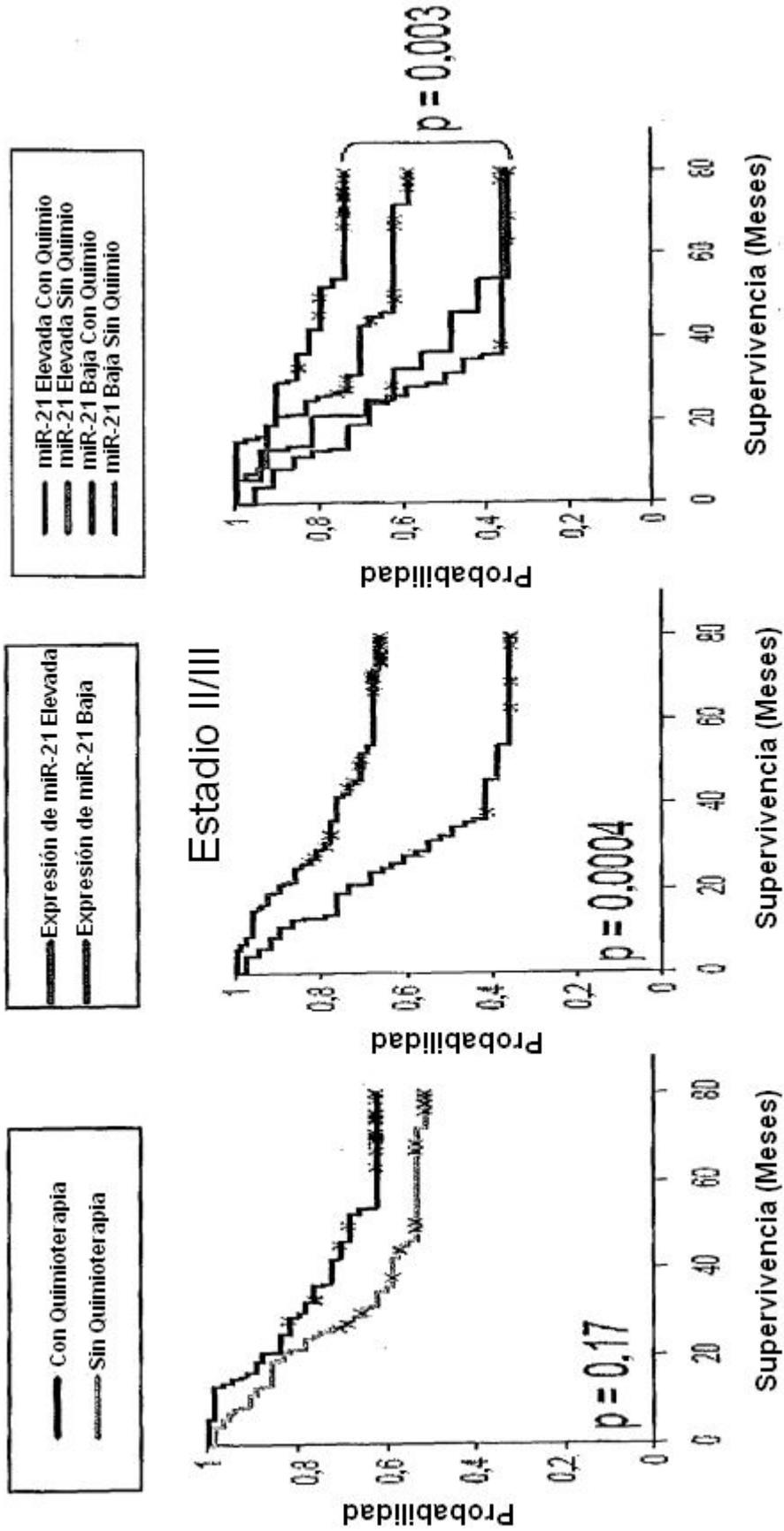


Figura 6a

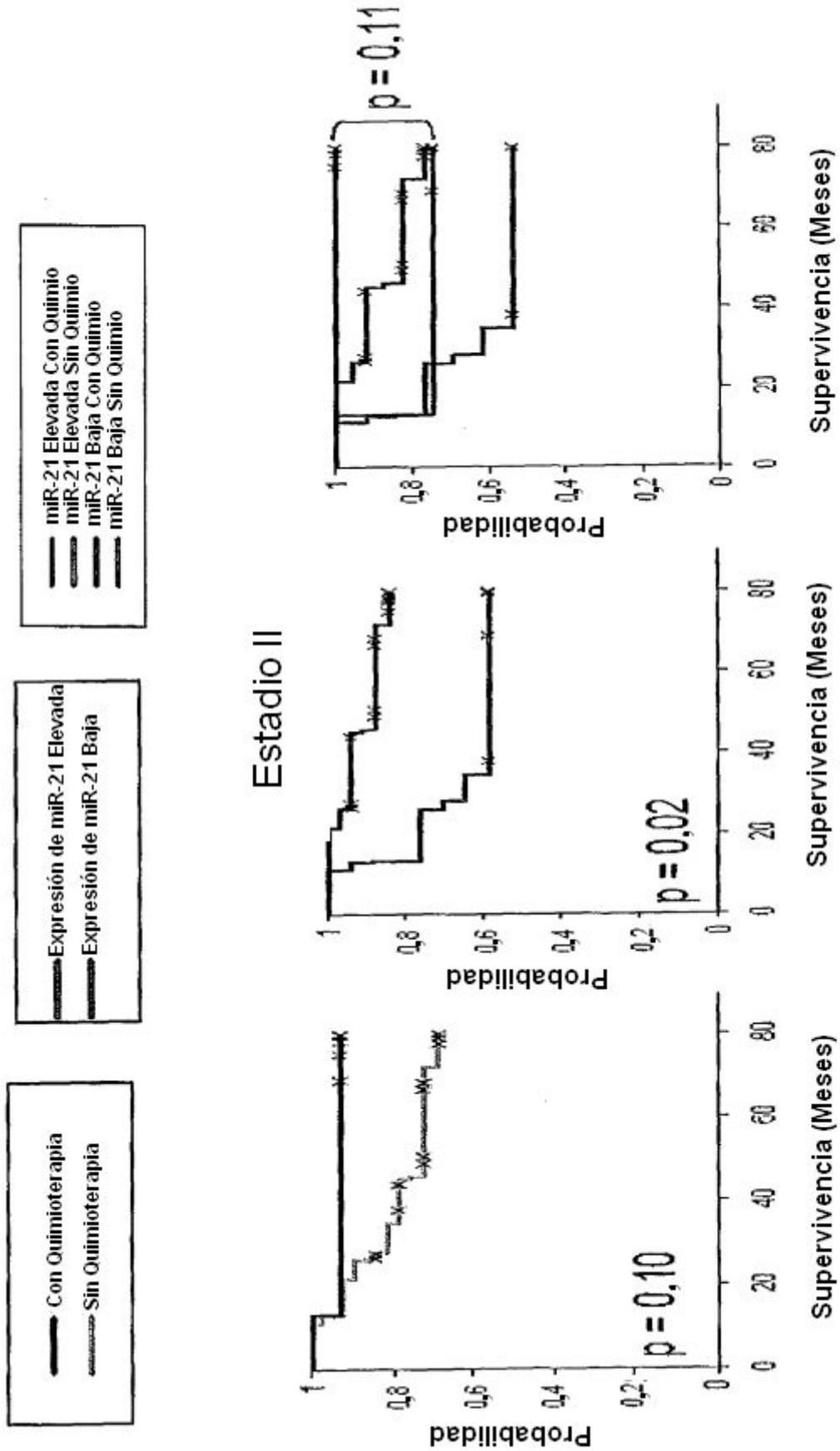


Figura 6b

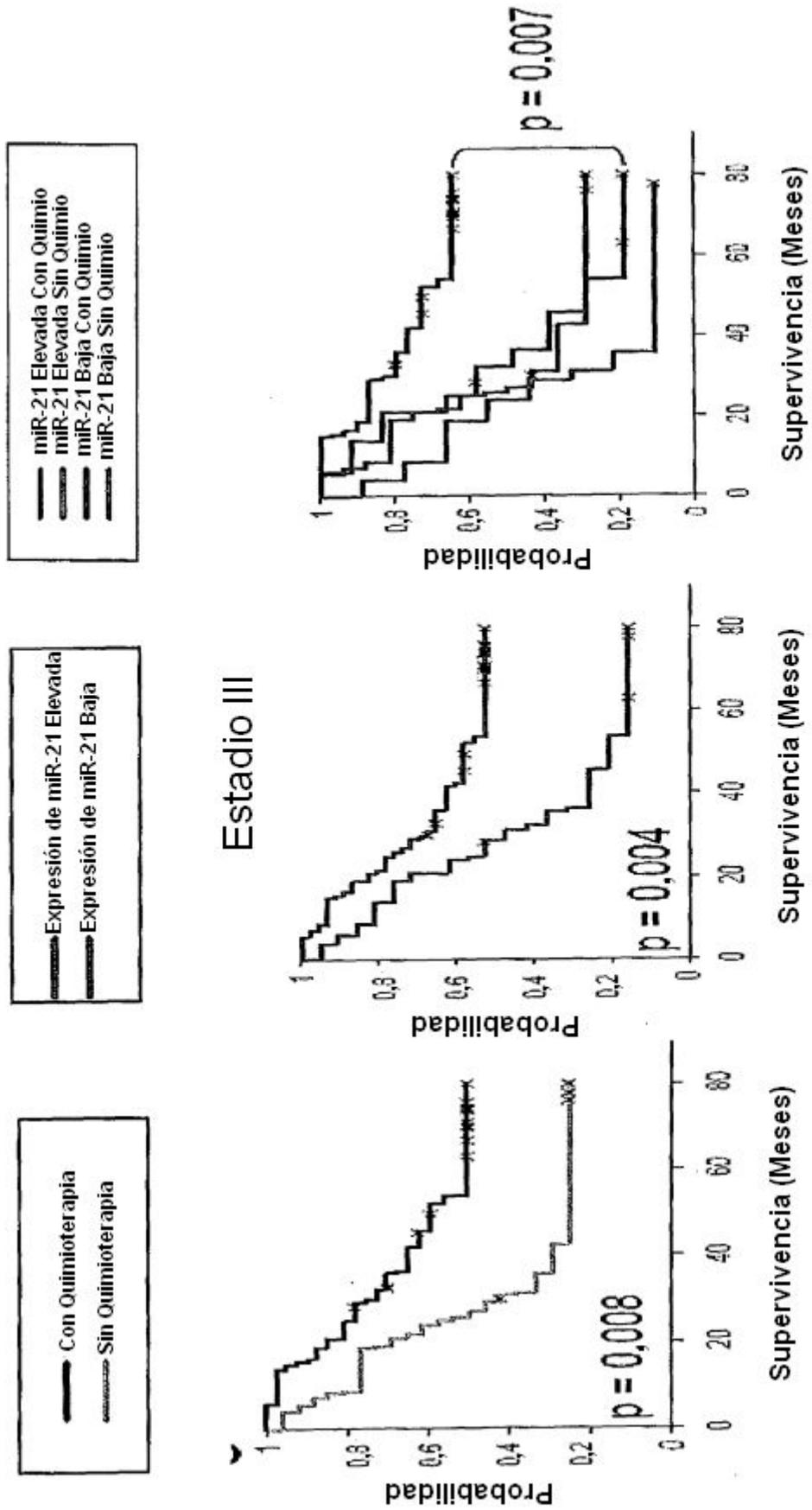
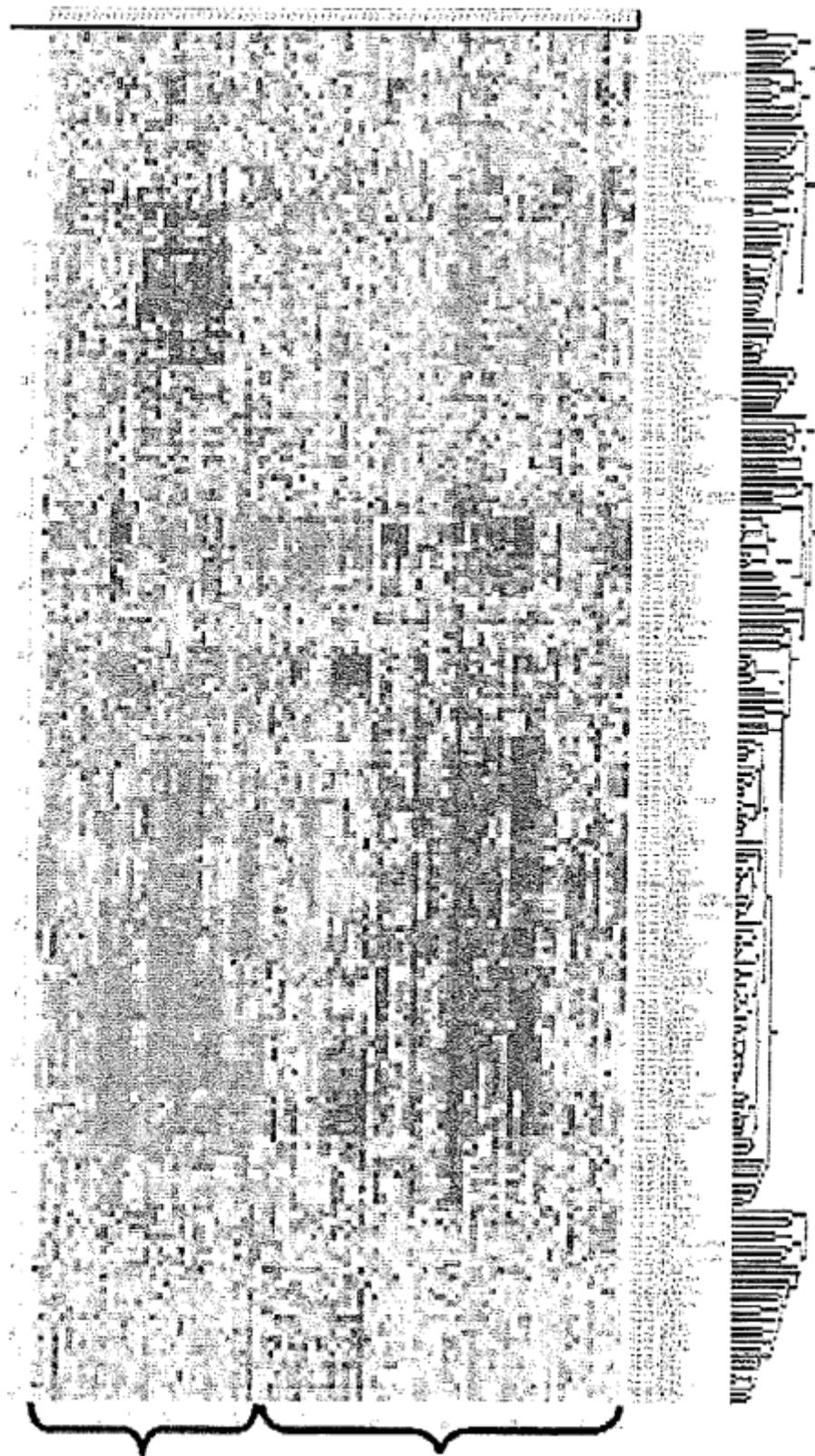


Figura 6c



Grupo A

Grupo B

Figura 7a

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

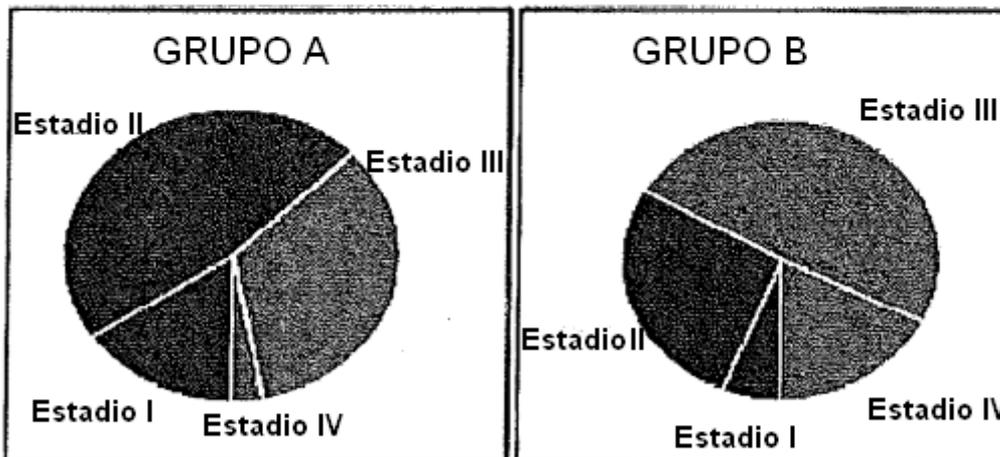


Figura 7b

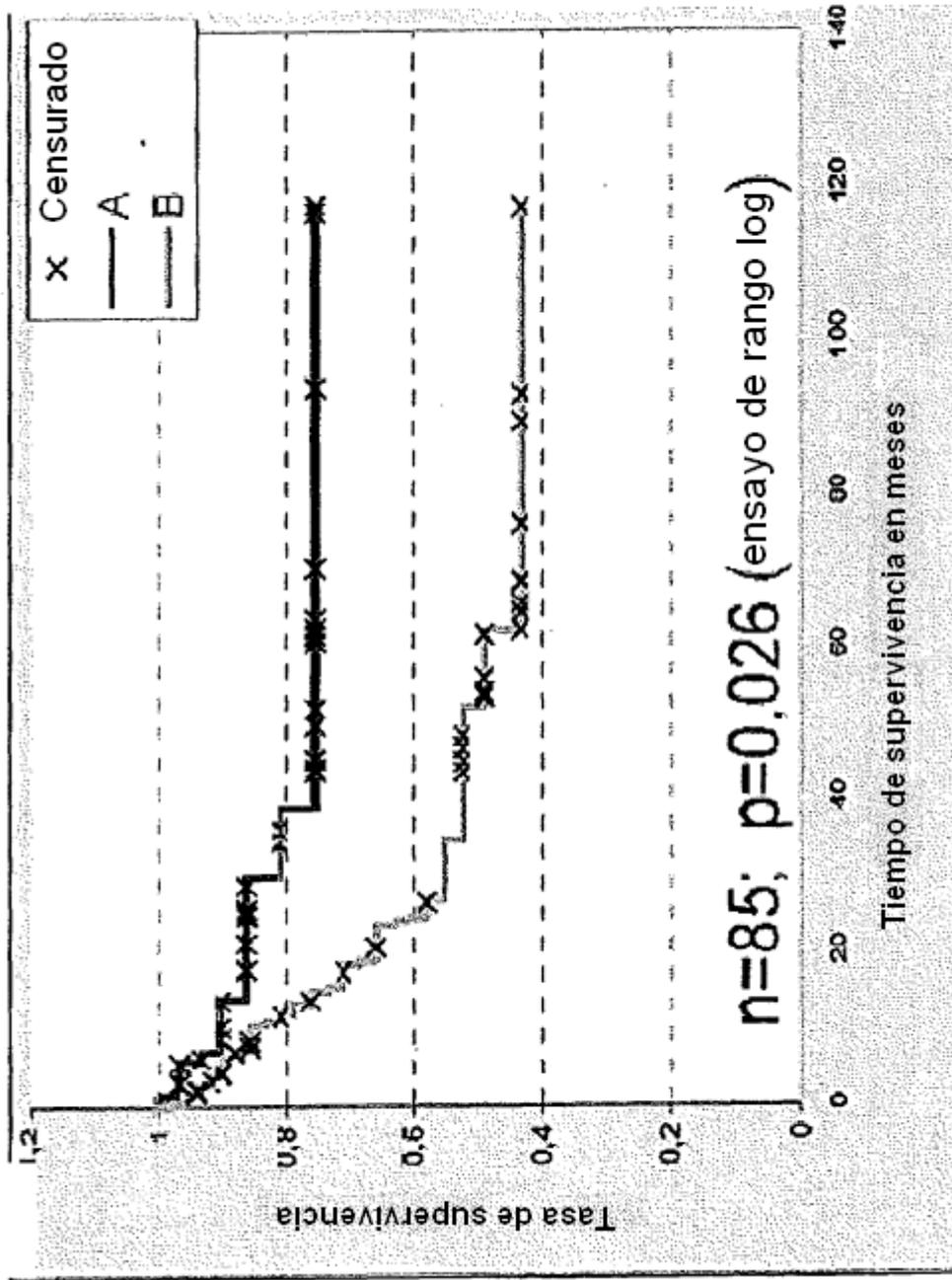


Figura 7c

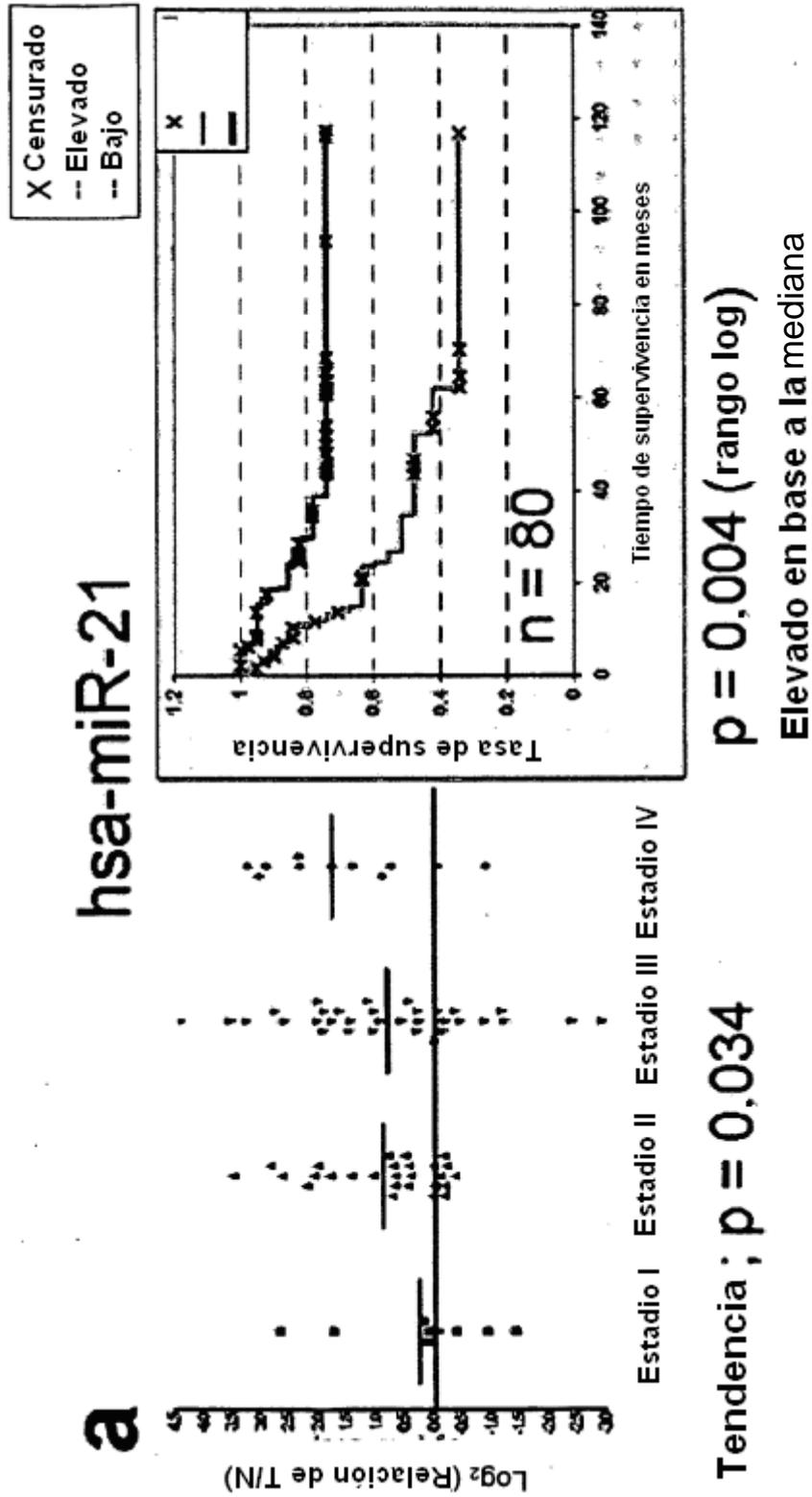


Figura 8a

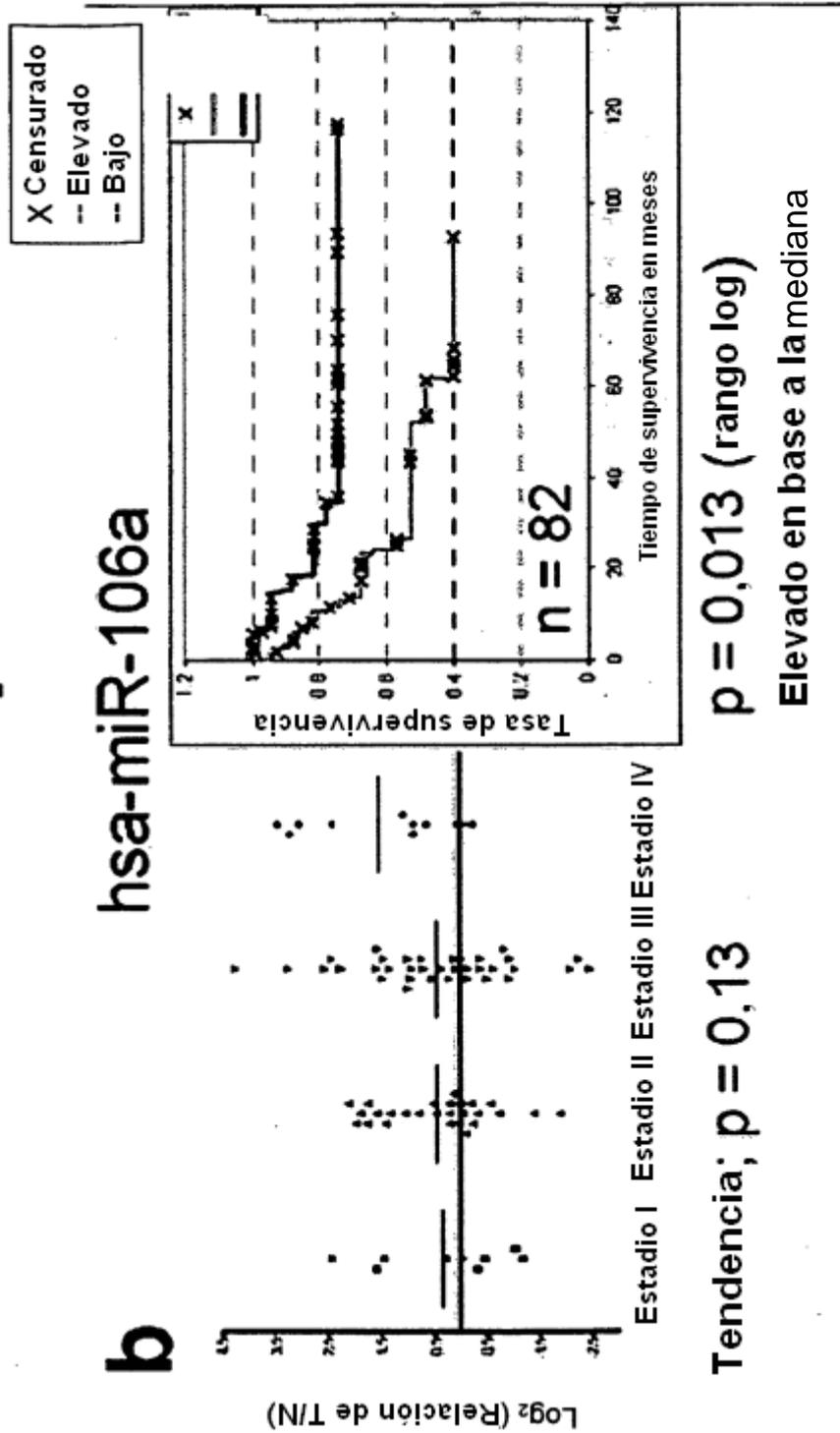


Figura 8b

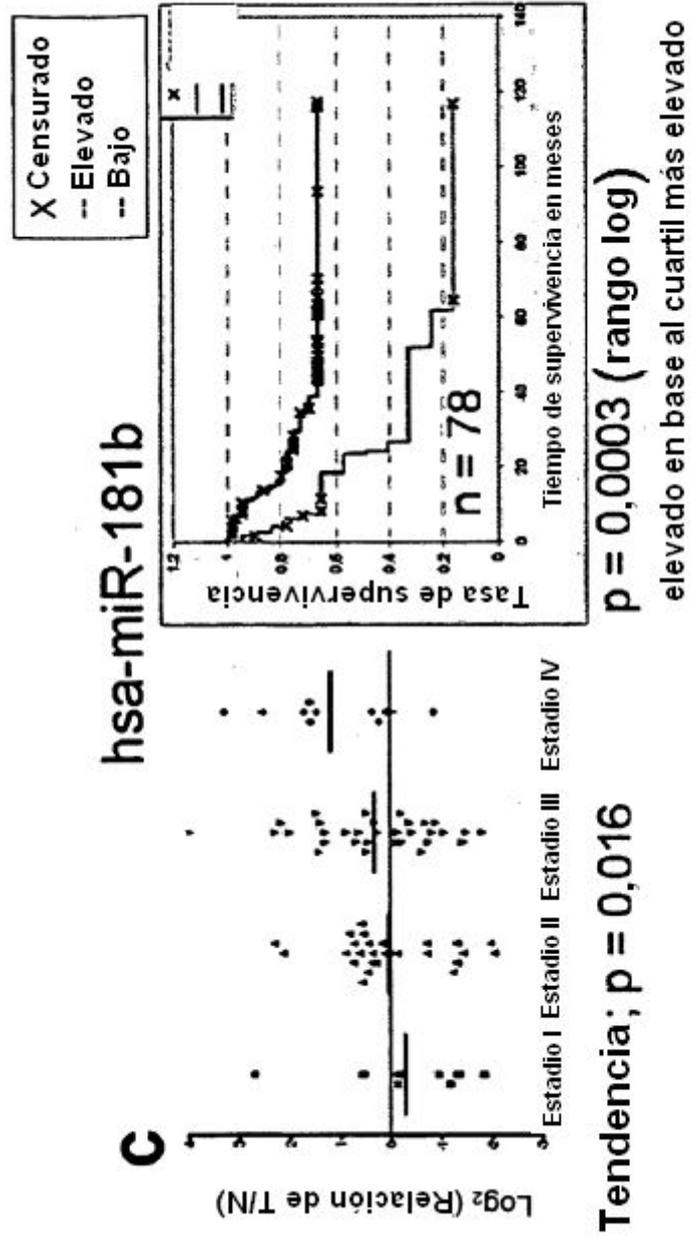


Figura 8c

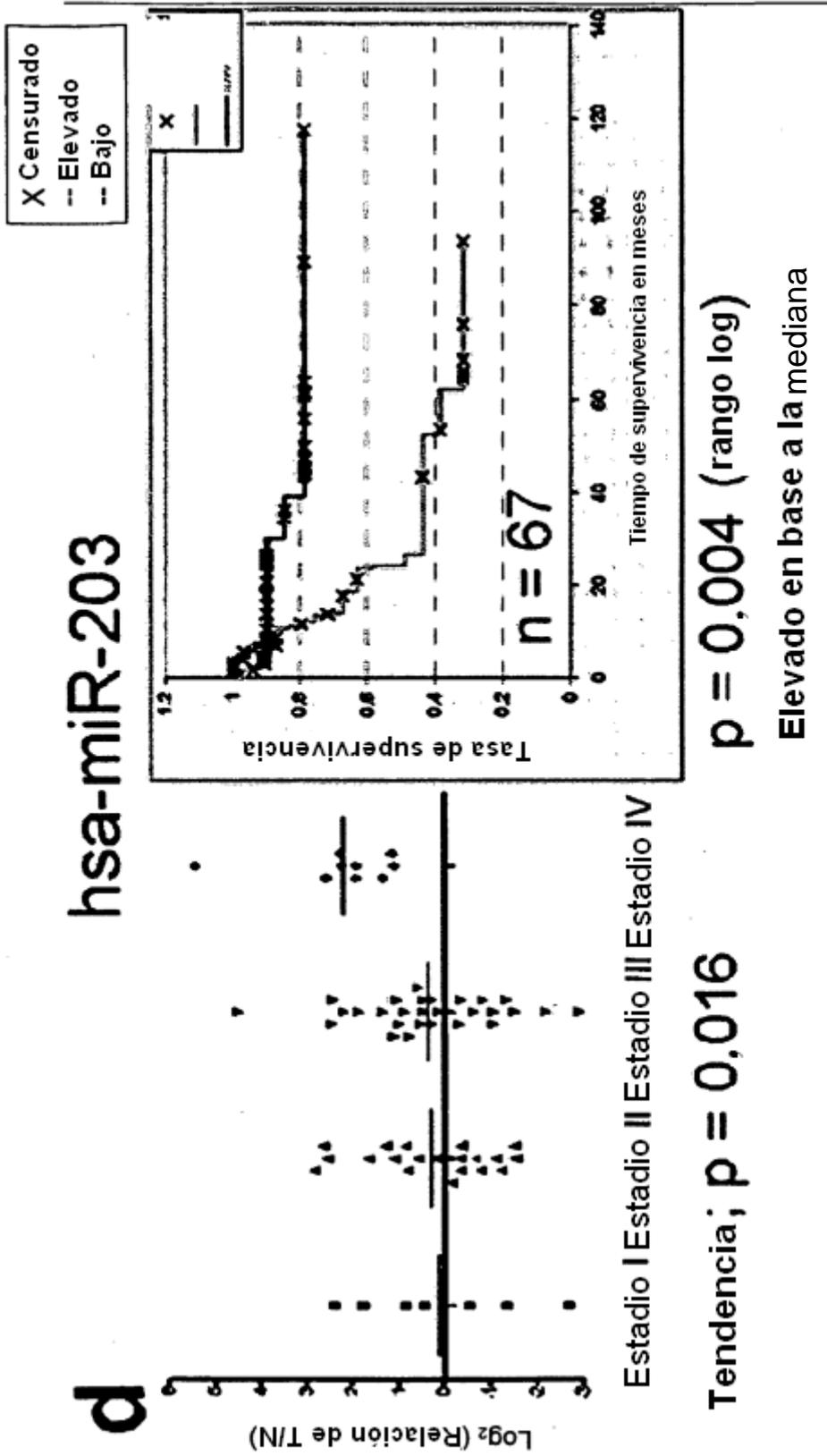
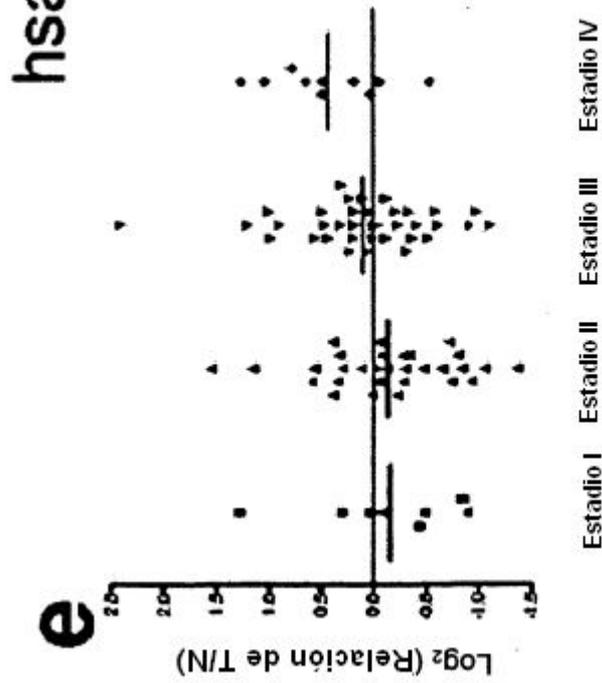
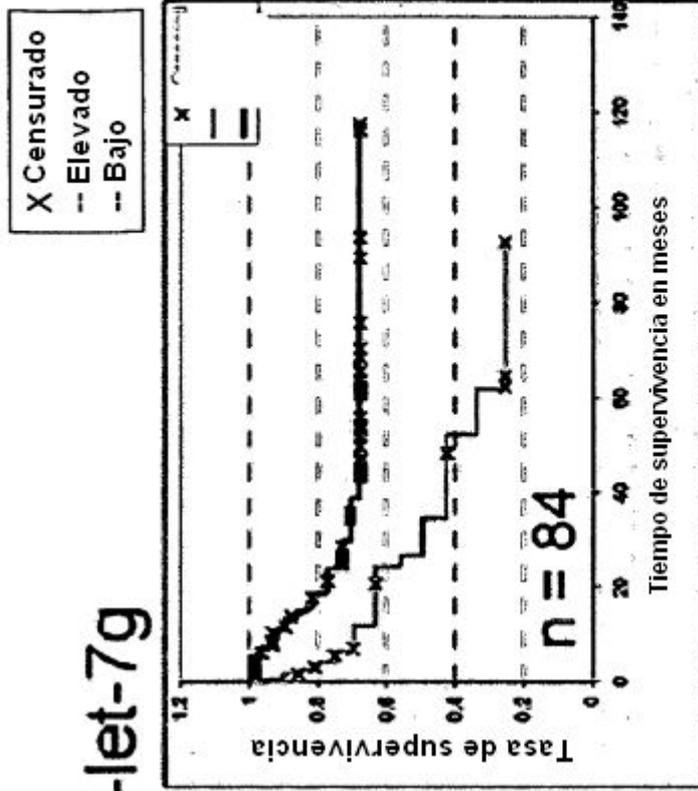


Figura 8d



Tendencia;  $p = 0,010$

hsa-let-7g



$p = 0,003$  (rango log)

elevado en base al cuartil más elevado

Figura 8e

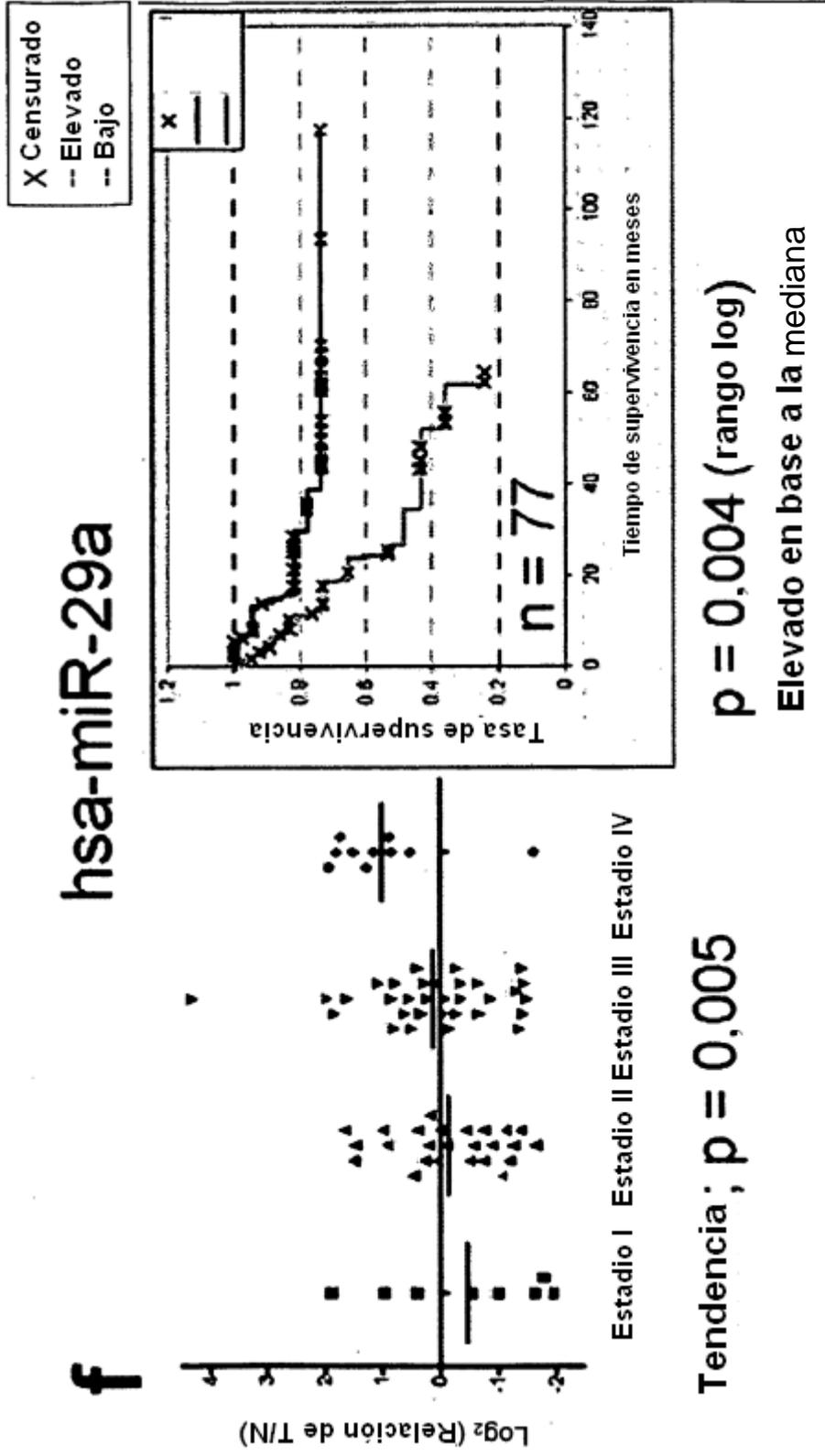


Figura 8f

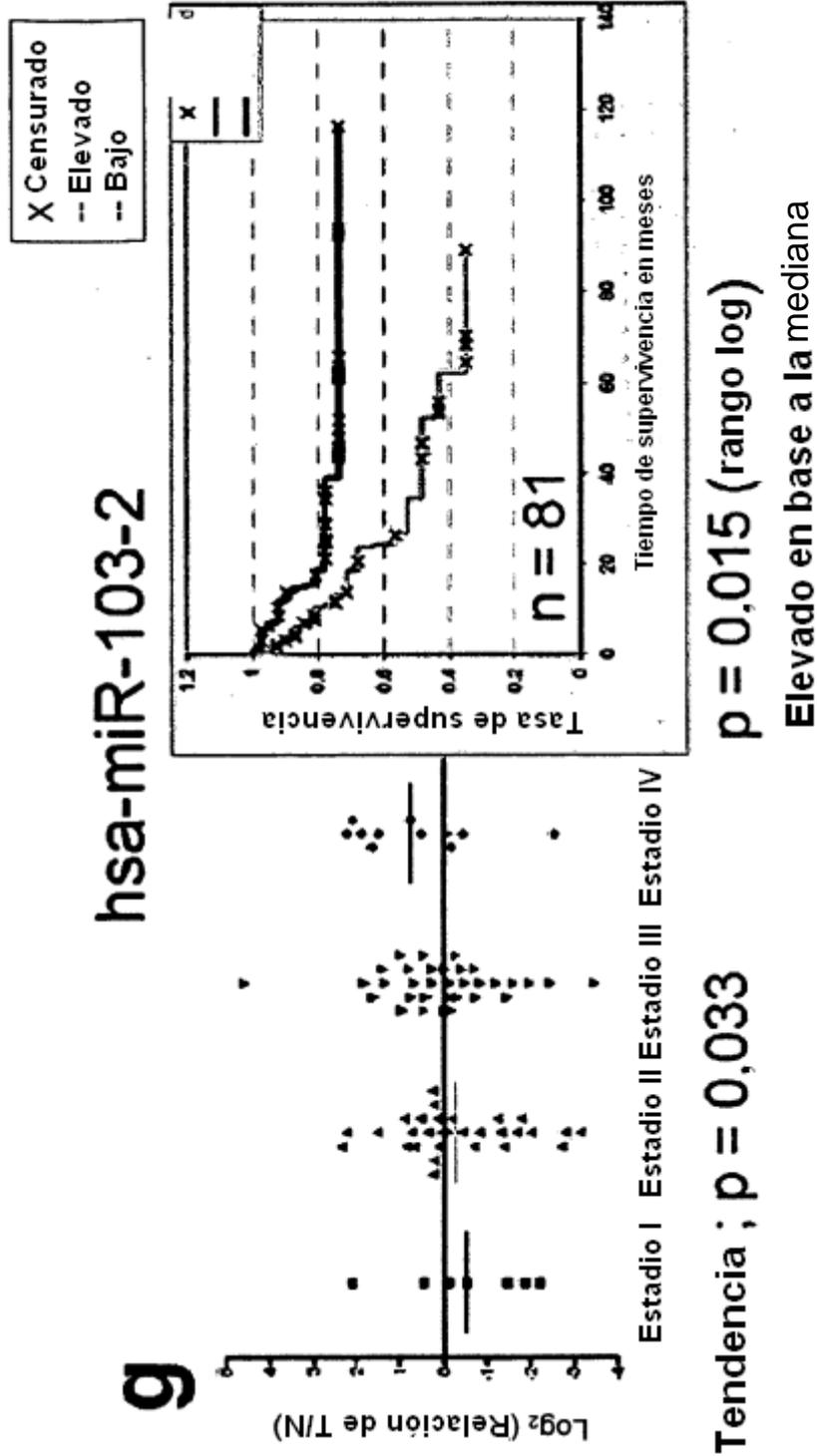


Figura 8g

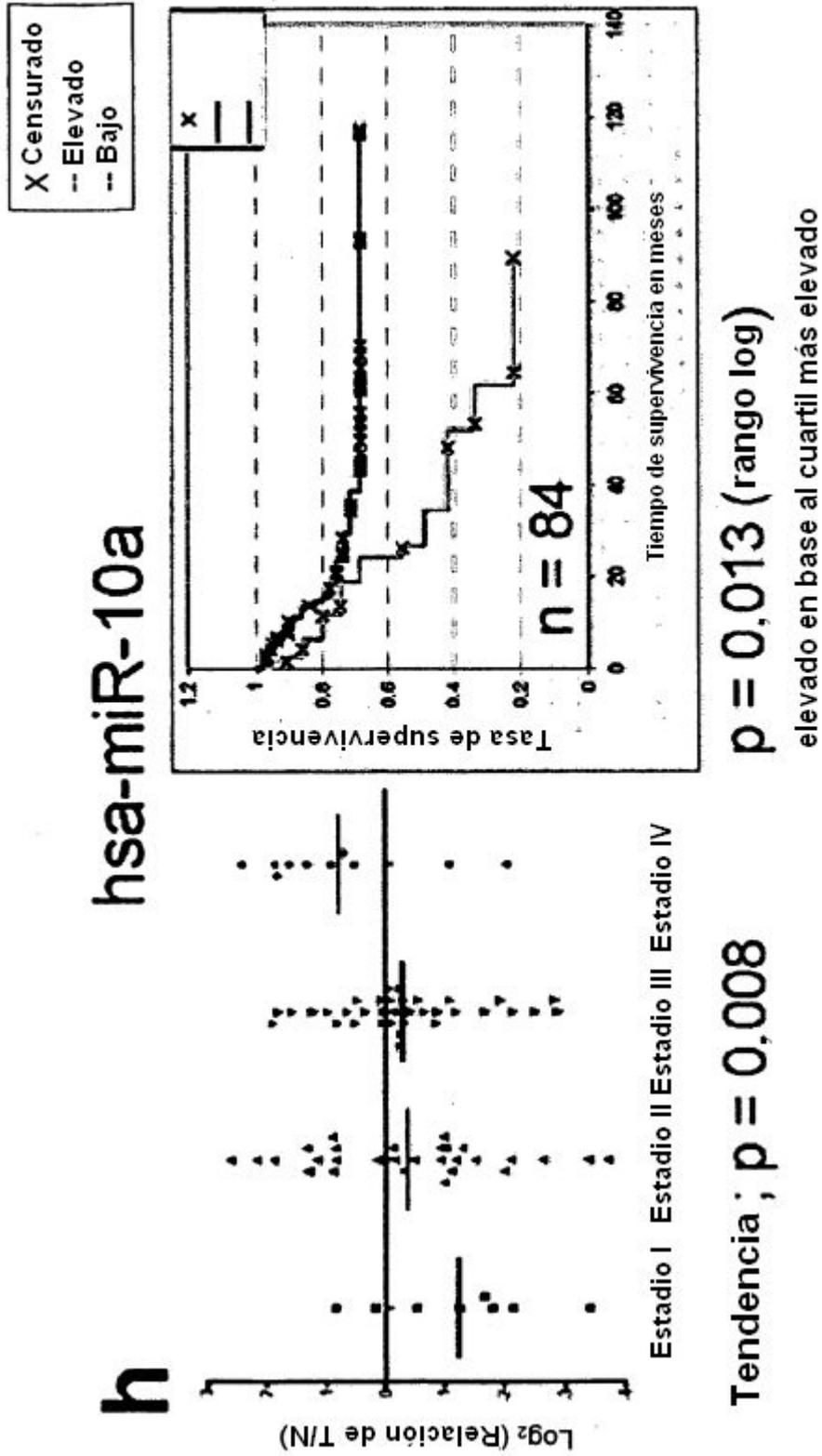
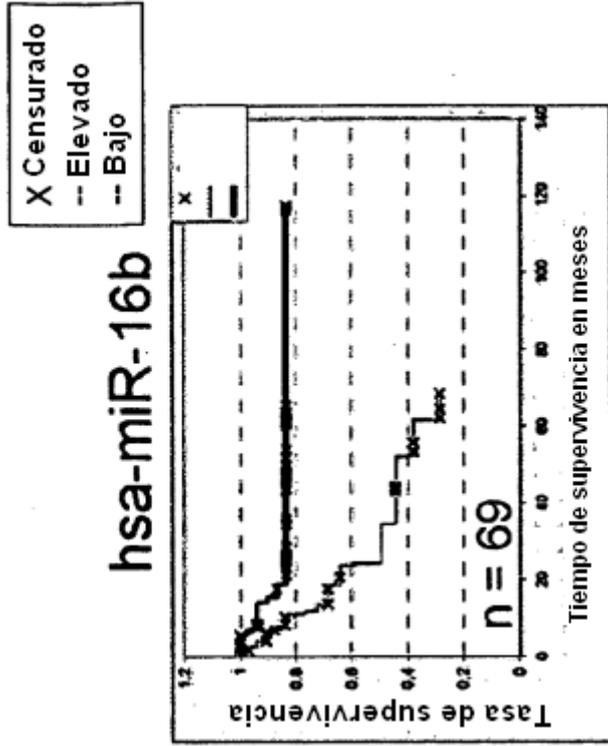
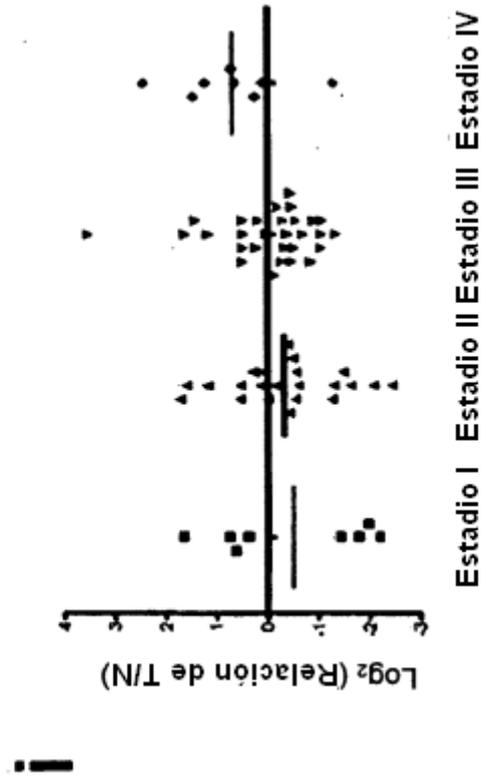


Figura 8h



**p = 0,001 (rango log)**  
**Elevado en base a la mediana**



**Tendencia; p = 0,048**

**Figura 8i**

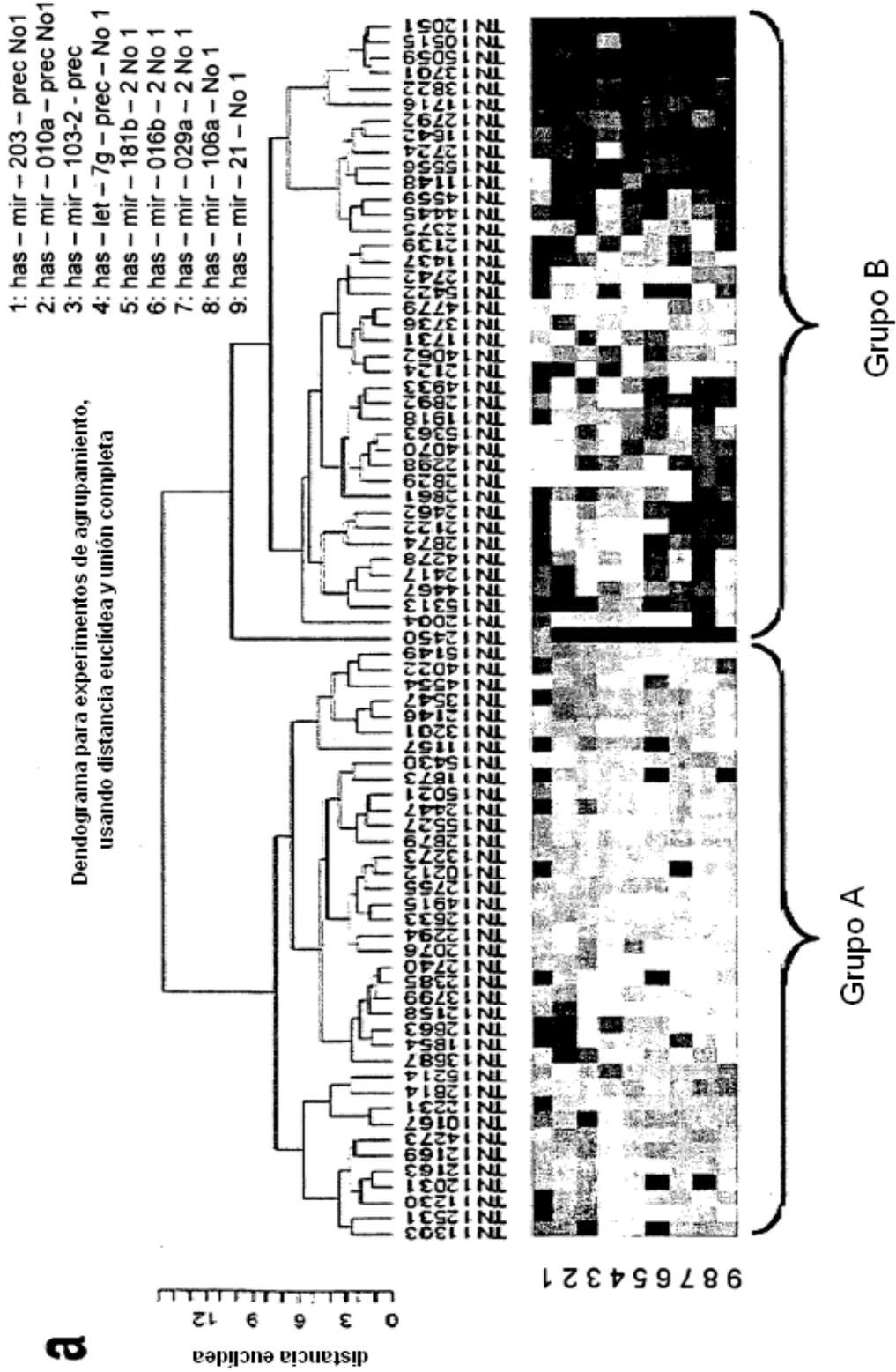


Figura 9a

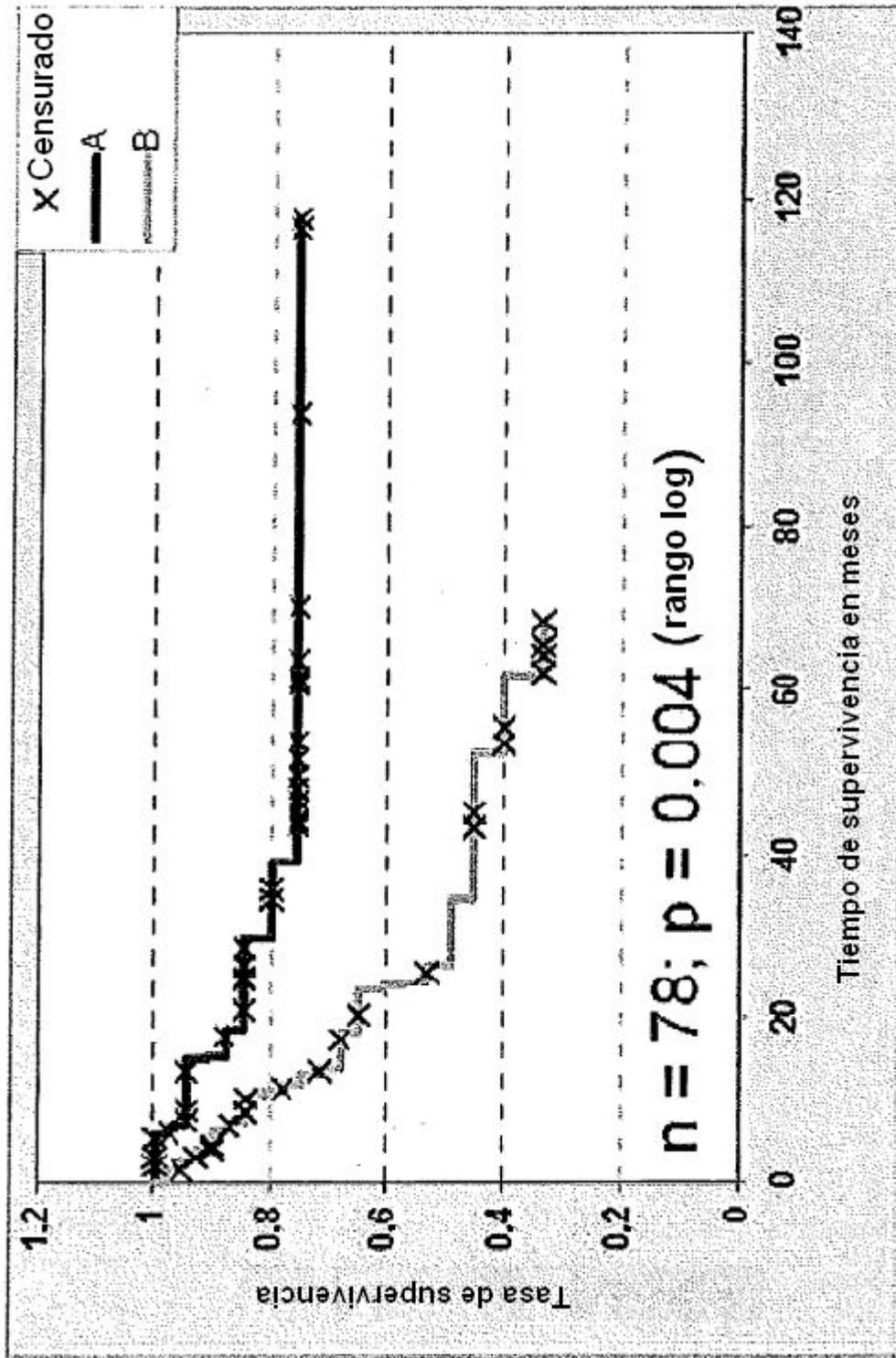


Figura 9b