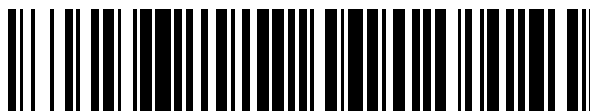


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 491**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2007** **E 07757822 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014** **EP 1991706**

54 Título: **Perfil de expresión de microARN asociado con cáncer de páncreas**

30 Prioridad:

02.03.2006 US 778271 P

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

14.03.2014

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (50.0%)**

1524 North High Street

Columbus, OH 43201-1063, US y

**THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY
OF OKLAHOMA (50.0%)**

72 Inventor/es:

SCHMITTGEN, THOMAS D. y

BRACKETT, DANIEL J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 448 491 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

Perfil de expresión de microARN asociado con cáncer de páncreas

5 Antecedentes

El cáncer de páncreas es la cuarta causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos. La tasa de mortalidad anual en los últimos cinco años ha sido de aproximadamente 30.000, con un número similar de nuevos casos diagnosticados cada año. El diagnóstico para el cáncer de páncreas es el peor de todos los tipos de cáncer con una relación de mortalidad/incidencia de 0,99. La incidencia del cáncer de páncreas en los Estados Unidos es de aproximadamente 9 por cada 100.000. Estas cifras desalentadoras, que reflejan las tasas de aumento de incidencia y de muerte, se deben a la falta de mejoras en las estrategias de detección y diagnóstico y la escasez de avances en los regímenes de tratamiento.

Los microARN (miARN) son ARN no codificantes cortos que se han identificado en el genoma de una amplia gama de especies. Los miARN fueron descubiertos por primera vez en *C. elegans* en 1993 y posteriormente se han descubierto en todos los organismos pluricelulares. Los miARN son reguladores negativos de la expresión genética y se cree que actúan principalmente a través de interacciones imperfectas de pares de bases a secuencias dentro de la región sin traducir 3' de los mARN que codifican proteínas. Hacia 2006, se habían descubierto 326 miARN en seres humanos. Mientras que el papel de cada uno de estos miARN se desconoce, los miARN específicos han sido implicados en la regulación de una serie diversa de procesos celulares que incluyen diferenciación de adipocitos, maduración de ovocitos, mantenimiento del estado celular pluripotente y regulación de la secreción de insulina.

Un número creciente de evidencias directas e indirectas sugiere una relación entre la expresión de miARN alterado y el cáncer. Estos incluyen miR-15a y miR-16-1 en leucemia linfocítica crónica, miR-143 y miR-145 en cáncer colorrectal, let-7 en cáncer de pulmón y miR-155 en linfoma difuso de linfocitos B grandes. La formación de perfiles de expresión se ha identificado en otros cánceres con expresión diferencial de varios miARN que incluyen cáncer de mama, glioblastoma y cáncer papilar de tiroides. Un policistrón que codifica cinco miARN está amplificado en linfomas de linfocitos B humanos y la expresión forzada del policistrón junto con c-myc fue tumorigénica, lo que sugiere que este grupo de miARN puede funcionar como oncogenes.

Se necesita un método para diagnosticar de forma fiable y precisa, o para la identificación sistemática de individuos con una predisposición al cáncer de páncreas. Además, es muy deseable un método para tratar el cáncer de páncreas.

Sumario

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de miARN que tienen una expresión alterada en el adenocarcinoma de páncreas.

La invención proporciona métodos, tal como se define en las reivindicaciones, para diagnosticar sin un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, adenocarcinoma ductal pancreático, que comprende medir el nivel de un producto génico de miR que es un precursor o forma madura de MIR-021.

Tal como se define en las reivindicaciones, los métodos pueden comprender medir combinaciones de productos génicos de miR y/o productos génicos de miR adicionales.

Además, se desvelan productos génicos de miR con expresión alterada seleccionados entre los siguientes grupos: MIR-034b, MIR-092-2-P, MIR-096-P, MIR-129-2, MIR-130a-P, MIR-133b, MIR-139, MIR-188b-P, MIR-192, MIR-200a-P, MIR-204, MIR-210, MIR-299-P, MIR-302d, MIR-337, MIR-371, MIR-378, MIR-383, MIR-422b, MIR-423, MIR-375, let-7a-2-P, let-7b, let-7c, let-7d, let-7f-1, let-7i, MIR-001-2, MIR-007-1, MIR-015a, MIR-015b, MIR-016-1, MIR-019b-1-P, MIR-021, MIR-023a, MIR-024-1,2, MIR-027a, b, MIR-029a,c, MIR-030d, MIR-032, MIR-092-1, MIR-098, MIR-099a, MIR-100, MIR-107, MIR-125b-1, MIR-126, MIR-128a, MIR-132, MIR-136, MIR-142-P, MIR-145-P, MIR-152, MIR-155, MIR-181a,c, MIR-196a-2, MIR-212, MIR-213, MIR-215, MIR-218-1,2, MIR-221, MIR-222-P, MIR-301, MIR-328, MIR-331-P, MIR-345, MIR-367, MIR-376, MIR-424 y combinaciones de los mismos.

En algunos casos, el nivel del producto génico en la muestra biológica es menor que el nivel de su producto génico de miR correspondiente en la muestra de control. Dichos productos génicos subexpresados incluyen: MIR-092-2-P, MIR-096-P, MIR-129-2, MIR-133b, MIR-139, MIR-188b-P, MIR-204, MIR-299-P, MIR-337, MIR-371, MIR-383, MIR-375 y combinaciones de los mismos.

En algunos casos, el nivel del producto génico de miR en la muestra biológica es mayor que el nivel de su producto génico de miR correspondiente en la muestra de control. Dichos productos génicos de miR sobreexpresados incluyen: let-7a-2-P, let-7b, let-7c, let-7d, let-7f-1, let-7i, MIR-001-2, MIR-007-1, MIR-015a, MIR-015b, MIR-016-1, MIR-019b-1-P, MIR-021, MIR-023a, MIR-024-1,2, MIR-027a, b, MIR-029a,c, MIR-030d, MIR-032, MIR-092-1, MIR-098, MIR-099a, MIR-100, MIR-107, MIR-125b-1, MIR-126, MIR-128a, MIR-132, MIR-136, MIR-142-P, MIR-145-P, MIR-152,

MIR-155, MIR-181a, c, MIR-196a-2, MIR-212, MIR-213, MIR-215, MIR-218-1,2, MIR-221, MIR-222-P, MIR-301, MIR-328, MIR-331-P, MIR-345, MIR-367, MIR-376, MIR-424, y combinaciones de los mismos.

- 5 Los métodos de la presente divulgación pueden incluir: (a) someter a ensayo los niveles de expresión de una pluralidad de productos génicos de miR en la muestra de ensayo para proporcionar un perfil de expresión de miR para la muestra de ensayo; y (b) comparar el perfil de expresión de miR de la muestra de ensayo con un perfil de expresión de miR correspondiente a partir de la muestra de control. Una diferencia entre el perfil de expresión de miR de la muestra de ensayo y el perfil de expresión de miR de la muestra de control es indicativo de que el sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, cáncer de páncreas.
- 10 Los productos génicos de miR múltiples pueden corresponder a una parte básica del complemento total de genes de miR en una célula. En otras realizaciones, los productos génicos de miR múltiples corresponden a aproximadamente un 95 %, un 90 %, un 80 %, un 70 % o un 60 % del complemento total de genes de miR en una célula.
- 15 Los productos génicos de miR múltiples pueden incluir uno o más productos génicos de miR seleccionados entre el grupo que consiste en: MIR-139, MIR096-P, MIR-375, let-7b, let-7d, let-7f-1, let-7i, MIR-155, MIR-181a, MIR-212, MIR-301, MIR-007-1, y MIR-021.
- 20 En nivel de dicho producto génico de miR se puede medir usando diversas técnicas que son bien conocidas en la técnica. Estas técnicas incluyen ensayos basados en amplificación, ensayos basados en hibridación, y análisis de micromatrices. El nivel del producto génico de miR se puede determinar midiendo la correspondiente copia genética de miR en la muestra.
- 25 La muestra biológica obtenida a partir del sujeto puede incluir tejido pancreático, tumor pancreático o células pancreáticas. La muestra biológica también puede incluir jugo pancreático.
- 30 Además, se desvela un kit para diagnosticar cáncer de páncreas en un sujeto que se sospecha que tiene, o que está en riesgo de desarrollar, cáncer de páncreas. Dicho kit incluye: (a) un medio para medir el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra biológica procedente del páncreas del sujeto, y (b) un medio para comparar el nivel del producto génico de miR en la muestra biológica con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control. Una diferencia detectada entre el nivel del producto génico de miR en la muestra biológica en comparación con el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra de control es indicativo de que el sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, cáncer de páncreas.
- 35 Además, se desvela un método para identificar sistemáticamente un sujeto que está en riesgo de desarrollar cáncer de páncreas. Dicho método incluye evaluar el nivel de al menos un producto génico de miR, o una combinación de productos génicos de miR, asociados con el cáncer de páncreas en una muestra biológica obtenida a partir del páncreas del sujeto, en el que una alteración en el nivel del producto génico de miR, o combinación de productos génicos de miR, en la muestra biológica en comparación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente
- 40 en una muestra de control, es indicativo de que el sujeto está en riesgo de desarrollar cáncer de páncreas.
- En una realización, la muestra biológica incluye tejido pancreático que es normal o se sospecha que es precanceroso.
- 45 Además, se desvela un método para inhibir la progresión del cáncer de páncreas en un sujeto cuyas células cancerosas de páncreas contienen una cantidad mayor de un producto génico de miR con respecto a las células de control. Dicho método incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula inhibidora que es capaz de reducir la cantidad del producto génico de miR en las células cancerosas de páncreas.
- 50 En algunos casos, la molécula inhibidora provoca silenciamiento post-transcripcional del producto génico de miR regulado de forma positiva o inhibe la maduración del producto génico de miR regulado de forma positiva. En algunos casos, la molécula inhibidora es un oligonucleótido antisentido de dicho producto génico de miR regulado de forma positiva, una ribozima, un ARN pequeño de interferencia (siARN), o una molécula capaz de formar una triple hélice con un gen que codifica el producto génico de miR regulado de forma positiva. En algunas realizaciones, el
- 55 compuesto inhibidor provoca la metilación del promotor del producto génico de miR, dando como resultado la expresión reducida del gen de miR.
- En un caso, la molécula inhibidora se administra como ARN desnudo, en conjunto con un agente de administración. En otro caso, la molécula inhibidora se administra como un ácido que codifica la molécula inhibidora.
- 60 Además, se desvela un método para inhibir la progresión del cáncer de páncreas en un sujeto cuyas células cancerosas de páncreas contienen una cantidad menor de un producto génico de miR con respecto a las células de control. Dicho método incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado que corresponde con el producto génico de miR.
- 65 En un caso, el producto génico de miR aislado es el miR maduro funcional. En otro caso, el producto génico de miR aislado es un oligonucleótido que comprende la secuencia en horquilla precursora de miR que contiene la parte en

bucle de la horquilla, o un oligonucleótido que comprende un precursor de miR duplex que carece de la horquilla.

En un caso, el producto génico aislado se administra como ARN desnudo, en conjunto con un agente de administración. En otro caso, el producto génico aislado se administra como un ácido nucleico que codifica el producto génico de miR aislado.

En otro método que se desvela en el presente documento, la progresión del cáncer se inhibe con la administración de un compuesto que provoca la hipometilación de la región promotora de un producto génico de miR regulado de forma negativa.

Además, se desvela una composición farmacéutica para tratar el cáncer de páncreas en un sujeto, en la que el sujeto presenta al menos un producto génico de miR subexpresado. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un producto génico de miR aislado corresponde al producto génico de miR subexpresado, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos un ácido nucleico que codifica el producto génico de miR subexpresado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un compuesto farmacéutico tal como se define en las reivindicaciones para tratar el cáncer de páncreas en un sujeto, en el que el sujeto presenta al menos un producto génico de miR sobreexpresado. El compuesto farmacéutico comprende al menos un oligonucleótido antisentido que es específico para el producto génico de miR sobreexpresado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un método tal como se define en las reivindicaciones para determinar la eficacia de un régimen terapéutico que inhibe la progresión del cáncer de páncreas en un sujeto.

La invención también proporciona un método tal como se define en las reivindicaciones para identificar un agente anticáncer de páncreas. Este método comprende las etapas de: (a) determinar el nivel de expresión de al menos un producto génico de miR que está sobreexpresado en una muestra biológica que contiene células cancerosas de páncreas, generando de este modo datos para un nivel de expresión antes del ensayo de dicho producto génico de miR; (b) poner en contacto la muestra biológica con un agente de ensayo; (c) determinar el nivel de expresión del producto génico de miR en la muestra biológica después de la etapa (b), generando de este modo datos para un nivel de expresión después del ensayo; y (d) comparar el nivel de expresión después del ensayo con el nivel de expresión antes del ensayo del producto génico de miR, en el que una disminución en el nivel de expresión después del ensayo del producto génico de miR es indicativo de que el agente del ensayo tiene propiedades anti-cáncer de páncreas.

La invención también proporciona otro método, tal como se define en las reivindicaciones, para identificar un agente anti-cáncer de páncreas, que comprende las etapas de: (a) determinar el nivel de expresión de al menos un producto génico de miR que está subexpresado en una muestra biológica que contiene células cancerosas de páncreas, generando de este modo datos para un nivel de expresión antes del ensayo de dicho producto génico de miR; (b) poner en contacto la muestra biológica con un agente de ensayo; (c) determinar el nivel de expresión del producto génico de miR en la muestra biológica, generando de este modo datos para un nivel después del ensayo; y (d) comparar el nivel de expresión después del ensayo con el nivel de expresión antes del ensayo de dicho producto génico de miR, en el que un aumento en el nivel de expresión después del ensayo del producto génico de miR es indicativo de que el agente de ensayo tiene propiedades anti-cáncer de páncreas.

Breve descripción las figuras

Figura 1. Procesamiento de miARN y diseño de cebadores. Los miARN tales como miR-18 humano se transcriben en forma de un (A) precursor primario grande (pri-miARN) que se procesa mediante la enzima nuclear Drosha para producir el (B) miARN precursor 62 nt supuesto (pre-miARN). Tanto el pri-miARN como el pre-miARN contienen la estructura en horquilla. La parte subrayada del pre-miARN representa la secuencia del (C) miARN maduro 22 nt que se procesa a partir del pre-miARN mediante la ribonucleasa Dicer. La línea sencilla representa el cebador directo; La línea doble representa el cebador inverso; La línea de puntos representa el cebador de sentido natural junto con el cebador inverso (negro) para amplificar solamente al pri-miARN.

Figura 2. Tabla de secuencias de producto génico de miR humano. Las secuencias representan precursores de miARN y la secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro. Todas las secuencias se representan en la orientación 5' a 3'.

Figura 3. Datos clínicos y patología tumoral.

Figura 4. Cebadores de PCR usados para amplificar los precursores de miARN humanos. p, cebadores a secuencia precursora primaria de miARN. Todos los de más cebadores hibridan con la horquilla presente tanto en el precursor primario como en el miARN precursor.

Figura 5. Expresión de rARN 18S en tejido pancreático. La expresión del control interno de rARN 18S se muestra en líneas celulares de tumores de páncreas, tejido benigno adyacente, páncreas normal, pancreatitis crónica y cáncer de páncreas. La expresión de rARN 18S, determinada usando PCR en tiempo real tal como se describe en el presente documento, se presenta como 2-CT. La línea de puntos, representa valor medio.

Figura 6. Mapa de calor de expresión del precursor de miARN en muestras de páncreas. A. La expresión relativa de precursores de miARN 201 se determinó por PCR en tiempo real; los datos se representan como ΔCT . La formación de grupos jerárquicos sin supervisar se realizó en un subconjunto de todo el conjunto de datos; los datos están sin filtrar. Un valor medio de expresión igual a uno se dibujó en negro; rojo, expresión aumentada; verde, expresión reducida; gris, expresión no detectable. B. Dendrograma que representa los resultados del análisis de formación de grupos jerárquicos del patrón de expresión de precursores de miARN en 47 muestras. Las muestras incluyen tumores de páncreas primarios (amarillo, N = 28), tejidos de páncreas normal (azul, N = 6), pancreatitis crónica (naranja, N = 4) y líneas celulares de cáncer de páncreas (turquesa, N = 9).

Figura 7. Expresión del precursor de miARN en muestras de páncreas. A. La expresión relativa de cada precursor de miARN se determinó por PCR en tiempo real; los datos se presentan como ΔCT . La formación de grupos jerárquicos sin supervisar se realizó en un subconjunto de 108 genes que se expresan en forma diferencial ($P < 0,001$) entre grupos (tumor, pancreatitis crónica, líneas celulares y tejido normal) tal como se determina mediante ensayo de comparación de múltiples grupos con ANOVA. Un valor medio de expresión igual a uno se dibujó en negro; rojo, expresión aumentada; verde, expresión reducida; gris, expresión no detectable. B. Dendrograma que representa los resultados del análisis de formación de grupos jerárquicos del patrón de expresión de precursores de miARN en 47 muestras. Las muestras incluyen tumores de páncreas primarios (N = 28), tejido benigno adyacente (N = 15), tejidos de páncreas normal (N = 6), pancreatitis crónica (N = 4) y líneas celulares de cáncer de páncreas (N = 9).

Figura 8. El mapa de terreno de expresión tridimensional se creó a partir de los datos filtrados de expresión del precursor de miARN presentados en la Fig. 7. Cada montaña representa una muestra individual (tumor, benigno adyacente, pancreatitis crónica, páncreas normal o línea celular de cáncer de páncreas). Las montañas rituales se clasifican en grupos pequeños basándose en sus similitudes o diferencias entre sí. Los puntos de colores representan los tipos de muestra: tumores, amarillo; tejido benigno adyacente, azul; tejidos de páncreas normal, negro; pancreatitis crónica, naranja; y líneas celulares de cáncer de páncreas, turquesa. Las líneas que conectan pares de muestras indican las muestras que tienen patrones muy similares de expresión de miARN con una correlación media por encima del umbral ($> 0,8$).

Figura 9. Probabilidades estimadas para los datos de formación y ensayo. Todos los datos de formación incluyen 6 muestras de páncreas normal y 18 de las que se sabe que son tumores de páncreas se clasifican correctamente (A). Once de cada 15 muestras benignas adyacentes y 10 muestras que se sabe que son tumores de páncreas se clasifican correctamente en el grupo de ensayo (B). Las otras se reparten entre la clase real (A) y la clase pronosticada (B).

Figura 10. 69 precursores de miARN más importantes expresados de forma anómala en adenocarcinoma de páncreas.

Figura 11. Análisis histológico y molecular de cáncer de páncreas para la expresión de microARN. El grupo A (400X) representa el análisis de hematoxilina y eosina de un adenocarcinoma de páncreas. Las glándulas de páncreas normal (flecha pequeña) están siendo invadidas por las glándulas mal formadas del carcinoma (flecha grande). El análisis en serie de la sección de miR-221 después de amplificación in situ del cADN correspondiente mostró que muchas de las células tumorales contenían la secuencia diana; obsérvese la localización del citoplasma (flechas, grupo B - 400X y a mayor aumento, grupo C - 1000X; la señal es azul debido a NBT/BCIP con contra teñidas con rojo rápido). La señal se perdió con omisión de los cebadores o con sustitución con cebadores específicos de HPV (grupo D, 400X). La sección adyacente en serie también mostró que muchas de las células tumorales expresaban miR-376a después de amplificación in situ del cADN (E, F). El grupo E (400X) muestra las células tumorales positivas (flecha grande) y las células del estroma negativas en las áreas de desmoplasia (flecha pequeña) mientras que el grupo F (400X) representa las células tumorales positivas (flecha grande) adyacentes a los acinos de glándulas de páncreas benignas negativas (flecha pequeña).

Figura 12. Expresión de miARN mediante transferencia de Northern. La expresión de ARN miR-100, -375, -155 y U6 se determinó en muestras de tejidos de cáncer de páncreas (T), tejido benigno adyacente (B) o páncreas normal (N). Las transferencias se extrajeron y se volvieron a sondear.

Figura 13. Validación de la expresión de miARN maduro y precursor.

Figura 14. Validación de niveles de miARN precursor y maduro. La expresión de ocho miARN se validó en seis muestras de páncreas normal, diez tejidos vecinos adyacentes y dieciséis adenocarcinomas de páncreas. La expresión relativa de los precursores miARN (barras abiertas) se determinó usando un ensayo de PCR en tiempo real a los precursores de miARN mientras que la expresión relativa del miARN maduro (barras cerradas) se

determinó usando un ensayo de PCR en tiempo real a los miARN maduros. Las diferencias medias en la expresión de miARN entre el páncreas normal (negro) y tumores (rojo) fue $P < 0,01$ significativo (ensayo de t de student). A, let-7i; B, miR-221; C, miR-100; D, miR-301; E, miR-21; F, miR-181a,c (precursor) y miR-181a (maduro); G, miR-125b-1 (precursor) y miR-125b (maduro); H, miR-212.

Figura. 15. Mapa de calor de la expresión de miARN maduro en muestras de páncreas. A. La expresión relativa de 184 miARN maduros descritos usando PCR en tiempo real en nueve tumores de cáncer de páncreas y en páncreas de seis donantes sin enfermedad pancreática. Los datos se representan como ΔCT . La formación de grupos jerárquicos sin supervisar se realizó en un subconjunto de todo el conjunto de datos; los datos están sin filtrar. Un valor medio de expresión igual a uno se dibujó en negro; rojo, expresión aumentada; verde, expresión reducida; gris, expresión no detectable. B. Dendrograma que representa los resultados del análisis de formación de grupos jerárquicos del patrón de expresión de precursores de miARN en 15 muestras.

Figura. 16. miARN maduros expresados de forma anómala en adenocarcinoma de páncreas.

Figura. 17. Ensayo de RT-PCR in situ aplicado a una sección de páncreas normal (A) y cáncer de páncreas (B), que demuestra que la mayor expresión de miR-21 se localiza en el tumor. MiR-21 maduro estaba básicamente aumentado en el tejido tumoral microdisecionado en comparación con los conductos de páncreas normal (C). La expresión de miR-21 maduro estaba aumentada en los tumores (D). La expresión de miR-21 maduro también estaba aumentada en todas las siete líneas celulares de cáncer de páncreas en comparación con las líneas celulares de páncreas normal (E).

Descripción detallada

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de productos génicos de microARN en particular cuya expresión está alterada en muestras biológicas obtenidas a partir de sujetos con adenocarcinoma de páncreas (en lo sucesivo en el presente documento "cáncer de páncreas") con respecto a determinadas muestras de control. La presente invención incluye métodos para diagnosticar si un sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, cáncer de páncreas. Además se desvelan métodos para identificar sistemáticamente sujetos que se cree que están en riesgo de desarrollar cáncer de páncreas, método para tratar el cáncer de páncreas mediante la inhibición de la progresión del cáncer de páncreas, y compuestos farmacéuticos que se pueden usar para dichos tratamientos. Además se proporcionan métodos para determinar la eficacia de regímenes terapéuticos para inhibir el cáncer de páncreas, y métodos para identificar un agente anticáncer de páncreas. Además se desvelan diversos kits adecuados para realizar los métodos que se han mencionado anteriormente.

La invención se describirá ahora con referencia a ejemplos más detallados. Los ejemplos ilustran como un experto en la materia puede preparar y usar la invención, y se describen aquí para proporcionar la capacidad mejor modo de la invención sin imponer ninguna limitación que no se mencione en las reivindicaciones.

A menos que se indique de otro modo, se debe entender que todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones están modificados en todos los casos con el término "aproximadamente." Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos que se exponen en la siguiente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener con la presente invención. Como mínimo, y no como un intento para limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debería interpretar la vista de los números de dígitos significativos aproximaciones habituales de redondeo.

A pesar de que los intervalos y parámetros numéricos que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos que se exponen en los ejemplos específicos se indican de forma tan precisa como sea posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente determinados errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontradas en sus respectivas medidas de ensayo. Cada intervalo numérico proporcionado a lo largo de toda la presente memoria descriptiva incluida cualquier intervalo numérico más estrecho que entre dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si todos dichos intervalos numéricos más estrechos estuvieran escritos expresamente en el presente documento.

La siguiente introducción es útil para comprender los términos que se usan en la presente descripción. Sin estar ligado a la siguiente teoría y con referencia a la Fig. 1, se cree que los microARN (o "miARN") están codificados con genes de miR que se transcriben en precursores de miARN individuales o en grupos.

Tal como se usa el presente documento de forma intercambiable, un "producto génico de miR," "microARN", o "miARN" se refiere a la transcripción de ARN sin procesar o procesado a partir de un gen de *miR*. La transcripción de gen de miR sin procesar también se denomina "precursor de miARN". Estos precursores de miARN se convierten en formas maduras de miARN a través de un procesamiento en etapas, tal como se representa en la Fig. 1. Se cree que el procesamiento genera primero (A) un precursor primario grande, o un "pri-miARN", que a continuación se procesa mediante la enzima nuclear Drosha para producir (B) un precursor supuesto, o un "pre-miARN". El pre-

miARN normalmente tiene 50-90 nucleótidos (nt), particularmente 60-80 nt. Las expresiones "precursores de miARN" o miARN "sin procesar" usadas en el presente documento son inclusivas tanto del pri-miARN como del pre-miARN se refieren a las moléculas A y/o B en la Fig. 1. Un miARN maduro activo de 19-25 nt se procesa a partir del pre-miARN con la ribonucleasa Dicer. La parte subrayada de la secuencia de pre-miARN en la Fig. 1 representa la secuencia del miARN maduro, que también se denomina transcripción genética de miR "procesado", y se representa como la molécula C en la Fig. 1.

La molécula de miARN activa o madura se puede obtener a partir del precursor de miARN a través de rutas de procesamiento naturales (*por ejemplo*, usando células intactas o lisados celulares) o mediante rutas de procesamiento sintético (*por ejemplo*, usando enzimas aisladas de procesamiento, tales como Dicer, Argonaut, o ARNasa III). Se entiende que la molécula activa de ARN de 19-25 nucleótidos también se puede producir directamente mediante síntesis biológica o química, sin que se haya procesado a partir del precursor de miR.

Además, haciendo referencia a la Fig. 1, las moléculas tanto de pri-miARN como de pre-miARN tienen una "secuencia en horquilla" característica, que es una secuencia de oligonucleótidos que tiene la primera mitad que es al menos parcialmente complementaria con una segunda mitad de la misma, provocando de este modo que las mitades se plieguen sobre sí mismas, formando una "estructura en horquilla". La estructura en horquilla se forma por lo general con una parte "troncal", que consiste en dar secuencias complementarias o parcialmente complementarias, y una parte "bucle", que es una región ubicada entre las dos letras complementarias del tronco, tal como se representa en la Fig. 1.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "expresión genética de miR" se refiere a la producción de productos génicos de miR a partir de un gen de miR, que incluye el procesamiento del precursor de miR en un producto génico de miARN maduro.

El nivel del producto génico de miR diana se mide en una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto. Por ejemplo, una muestra biológica se puede retirar de un sujeto del que se sospecha que padece cáncer de páncreas. Dicha muestra biológica puede incluir un tejido o biopsia celular obtenidos a partir de la región del páncreas de la que se sospecha que es precancerosa o cancerosa. Como alternativa, una muestra biológica puede incluir jugo pancreático extraído después de estimulación del páncreas. En otro ejemplo, una muestra de sangre se puede extraer del sujeto. En la técnica se conoce el uso de muestras de jugo pancreático, por ejemplo, tal como se describe en Fukushima, N., et al., (2003), Cancer Biol Ther. 2:78-83; Rosty, C. et al. (2002), Hematol Oncol Clin North Am. 16:37-52; Matsubayashi, H., et al., (2005), Clinical Cancer Research 11:573-583; y Grønborg, M., et al., (2004) Journal of Proteome Research, 3 (5), 1042-1055.

Una muestra de control correspondiente se puede obtener a partir de tejidos de páncreas sin afectar del sujeto, a partir de un sujeto normal o población de sujetos normales. La muestra de control se procesa a continuación junto con la muestra de ensayo del sujeto, de modo que los niveles de producto génico de miR producido a partir de un gen de miR dado en la muestra del sujeto se pueden comparar con los niveles correspondientes de producto génico de miR a partir de la muestra de control.

Tal como se usa el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal cuya muestra biológica contiene un producto génico de miR. El animal puede ser un mamífero y puede incluir animales mascota, tales como perros y gatos; animales de granja, tales como vacas, caballos y ovejas; animales de laboratorio, tales como ratas, ratones y conejos; y primates, tales como monos y seres humanos. En una realización, el mamífero es ser humano o ratón.

Una alteración (*es decir*, un aumento o disminución) en el nivel de un producto génico de miR en la muestra obtenida a partir del sujeto, con respecto al nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control, es indicativo de la presencia de cáncer de páncreas en el sujeto. En algunas realizaciones, en nivel de producto génico de miR diana 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 se "regula de forma positiva" o el producto génico de miR se "sobreexpresa"). Tal como se usa en el presente documento, la expresión de un producto génico de miR se "regula de forma positiva" con la cantidad de producto génico de miR en una muestra de ensayo a partir de un sujeto es mayor que la cantidad del mismo producto génico en una muestra de control.

En algunas realizaciones, los productos génicos de miR regulados de forma positiva incluyen uno o más de los siguientes: let-7a-2-P, let-7b, let-7c, let-7d, let-7f-1, let-7i, MIR-001-2, MIR-007-1, MIR-015a, MIR-015b, MIR-016-1, MIR-019b-1-P, MIR-021, MIR-023a, MIR-024-1,2, MIR-027a, b, MIR-029a,c, MIR-030d, MIR-032, MIR-092-1, MIR-098, MIR-099a, MIR-100, MIR-107, MIR-125b-1, MIR-126, MIR-128a, MIR-132, MIR-136, MIR-142-P, MIR-145-P, MIR-152, MIR-155, MIR-181a, c, MIR-196a-2, MIR-212, MIR-213, MIR-215, MIR-218-1,2, MIR-221, MIR-222-P, MIR-301, MIR-328, MIR-331-P, MIR-345, MIR-367, MIR-376, MIR-424.

En otras realizaciones, el nivel del producto génico de miR diana 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 se "regula de forma negativa" o el producto génico de miR se "subexpresa"). Tal como se usa en el presente documento, la expresión de un gen de miR se "regula de forma negativa" contra la cantidad de producto génico de miR en una muestra de ensayo a partir de un sujeto es menor que la cantidad del mismo producto génico en una muestra de control. La expresión genética relativa de miR en las muestras de control se puede determinar con respecto a uno o más patrones de expresión de ARN. Los patrones pueden comprender, por ejemplo, el nivel medio de expresión genética de miR obtenido anteriormente para una población de controles normales.

En algunas realizaciones, los regulados productos génicos de miR de forma negativa incluyen uno o más de los siguientes: MIR-092-2-P, MIR-096-P, MIR-129-2, MIR-133b, MIR-139, MIR-188b-P, MIR-204, MIR-299-P, MIR-337, MIR-371, MIR-383, MIR-375.

Dado que más de un producto génicos de miR está asociado con cáncer de páncreas, se entiende que el cáncer de páncreas se puede diagnosticar mediante la evaluación de uno cualquiera de los productos génicos de miR enumerados, o mediante evaluación de cualquier combinación de los productos génicos de miR enumerados que cuando se describen, son diagnóstico de cáncer de páncreas. En algunos ejemplos, se evalúa un producto génico de miR que está exclusivamente asociado con el adenocarcinoma de páncreas.

Un cambio en los niveles de los productos génicos de miR asociados con cáncer de páncreas se puede detectar antes de, o en las primeras etapas de, el desarrollo de fenotipos transformados o neoplásicos en células de un sujeto. Por lo tanto, la invención también proporciona un método para identificar sistemáticamente a un sujeto que está en riesgo de desarrollar cáncer de páncreas, que comprende evaluar el nivel de al menos un producto génico de miR, o una combinación de productos génicos de miR, asociado con cáncer de páncreas en una muestra biológica obtenida a partir del páncreas del sujeto. Por consiguiente, una alteración en el nivel del producto génico de miR, o combinación de productos génicos de miR, en la muestra biológica en comparación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control, es indicativo de que el sujeto está en riesgo de desarrollar cáncer de páncreas. La muestra biológica usada para dicha identificación sistemática puede incluir tejido pancreático que es normal o que se sospecha que es precancerosa. Los sujetos con un cambio en el nivel de uno o más productos génicos de miR asociado con cáncer de páncreas son candidatos para control y ensayo adicional. Dicho ensayo adicional puede comprender examen histológico de muestras de tejido, u otras técnicas dentro de la experiencia en la materia.

El término "secuencia de nucleótidos diana" o "nucleótido diana", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia de polinucleótidos que se busca detectar. La secuencia de nucleótidos diana pretende incluir ADN (por ejemplo, cADN o ADN genómico), ARN, análogos del ADN o ARN generado usando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos de los mismos.

El nivel de un producto génico de miR en una muestra se puede medir usando cualquier técnica que se adecua a detectar los niveles expresión de ARN en una muestra biológica. Las técnicas adecuadas para determinar los niveles expresión de ARN en una muestra biológica incluyen ensayos basados en amplificación y basados en hibridación.

Los ensayos basados en amplificación usan una secuencia de ácidos nucleicos del producto génico de miR, o el gen *miR*, como una matriz en una reacción de amplificación (por ejemplo reacción en cadena de la polimerasa o PCR). El número relativo de transcripciones genéticas de miR también se puede determinar por transcripción inversa de transcripciones genéticas de miR, seguido de amplificación de las transcripciones que se transcriben de forma inversa por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los niveles de transcripciones genéticas de miR se pueden cuantificar en comparación con un patrón interno, por ejemplo, el nivel de mRNA de un gen "constitutivo" presente en la misma muestra. Un gen "constitutivo" adecuado para uso como un patrón interno incluye, por ejemplo, rARN 18S, miosina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de amplificación será proporcional a la cantidad de matriz en la muestra original. Los métodos de PCR cuantitativa en tiempo real o RT-PCR que usan sondas TaqMan son bien conocidos en la técnica y se describen por ejemplo, en Heid et al. 1996, Real time quantitative PCR, Genome Res., 10: 986-994; y Gibson et al., 1996, A novel method for real time quantitative RT-PCR, Genome Res. 10: 995-1001. Un método de RT-PCR en tiempo real cuantitativa que puede determinar el nivel de expresión de las transcripciones de todos los genes de miR conocidos correlacionados con un cáncer se describen en Jiang, J., et al. (2005), Nucleic Acids Res. 33, 5394-5403; Schmittgen T. D., et al. (2004), Nucleic Acids Res. 32, E43; y Solicitud Provisional de Estados Unidos con N° de Serie 60/656.109, presentada el 24 de febrero de 2005. Otros ejemplos ensayos basados en amplificación para la detección de miARN son bien conocidos en la técnica, véanse por ejemplo la descripción en la Solicitud de PAT de Estados Unidos N° 2006/0078924.

También se pueden usar ensayos basados en hibridación para detectar el nivel de productos génicos de miR en una muestra. Estos ensayos, que incluyen por ejemplo análisis de transferencia de Northern, hibridación in situ, hibridación en disolución, y ensayo de protección de ARNasa (Ma YJ, et al. (1996) RNase protection assay, Methods, 10: 273-8) son bien conocidos por los expertos en la materia. Tal como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se refiere a la interacción de emparejamiento de

bases complementarias de un ácido nucleico con otro ácido nucleico que da como resultado la formación de una estructura duplex, triplete, o de otro orden superior, y se usa en el presente de forma intercambiable con "hibridación". Por lo general, la interacción primaria es específica de bases, por ejemplo, A/T y G/C, mediante enlace de hidrógeno de tipo Watson/Crick y Hoogsteen. El apilamiento de bases y las interacciones hidrófobas también pueden contribuir a la estabilidad del duplex. Las condiciones para sondas y cebadores detectores de hibridación a secuencias diana complementarias y básicamente complementarias son bien conocidas, por ejemplo, tal como se describe, por ejemplo, en *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, B. Hames y S. Higgins, eds., IRL Press, Washington, D.C. (1985). En general, dicha hibridación se produce, se ve influenciada por, entre otras cosas, la longitud de los polinucleótidos y la complementariedad, el pH, la temperatura, la presencia de cationes mono- y divalentes, la proporción de nucleótidos G y C en la región de hibridación, la viscosidad del medio, y la presencia de agentes desnaturizantes. Dichas variables influyen en el tiempo necesario para la hibridación. Por lo tanto, las condiciones preferentes de hibridación dependerán de la aplicación en particular. Dichas condiciones, sin embargo, las puede determinar de forma rutinaria un experto habitual en la materia sin experimentación indebida. Se observada que la complementariedad no necesita ser perfecta; puede haber un pequeño número de desemparejamientos de pares de bases que interferirán mínimamente con la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios de las presentes enseñanzas. Sin embargo, si el número de desemparejamientos de pares de bases es tan grande que no se puede producir hibridación en condiciones mínimamente restrictivas, entonces la secuencia generalmente no es una secuencia diana complementaria. Por lo tanto, en el presente documento, la complementariedad se refiere a que las sondas o cebadores son lo suficientemente complementarias con la secuencia diana para hibridarse en las condiciones de reacción seleccionadas para conseguir los fines de las presentes enseñanzas.

Una técnica adecuada para determinar el nivel de transcritos de ARN de un gen en particular en una muestra biológica es la transferencia de Northern. Por ejemplo, el ARN celular total se puede purificar a partir de células por homogeneización en presencia de tampón de extracción de ácidos nucleicos, seguido de centrifugación. Se hace precipitar a los ácidos nucleicos, y el ADN se retira por tratamiento con DNasa y precipitación. Las moléculas de ARN se separan a continuación por electroforesis en gel sobre geles de agarosa de acuerdo con técnicas convencionales, y se transfieren a filtros de nitrocelulosa. A continuación, el ARN se inmoviliza en los filtros por calentamiento. La detección y la cuantificación del ARN específico se consigue usando sondas de ADN o de ARN marcadas apropiadamente complementarias con el ARN en cuestión. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook et al., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 7.

Se pueden producir son las adecuadas para hibridación por transferencia de Northern de un producto génico de miR dado a partir de las secuencias de ácidos nucleicos que se proporcionan en la Fig. 2 o secuencias publicadas de especies conocidas de miARN que están disponibles, por ejemplo en el registro de miARN en (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>) (Griffiths-Jones, S., *The microRNA Registry*. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32 (1): p. D109-11.). Métodos para la preparación de sondas de ADN y ARN marcadas, y las condiciones para la hibridación de las mismas a secuencias de nucleótidos diana, se conocen y se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook et al., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulos 10 y 11.

Además de técnicas de hibridación de ARN de Northern y otras, 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 cubre o portaobjetos de microscopio y sondear el contenido de ácidos nucleicos de la célula con una solución que contiene sondas de ácido nucleico radiactivo o marcado de otro modo (por ejemplo, cADN o ARN). Esta técnica es particularmente bien adecuada para analizar muestras de biopsia de tejidos a partir de sujetos. La práctica de la técnica de hibridación in situ se describe con más detalle en la Patentes de Estados Unidos N° 5.427.916.

Se pueden producir sondas adecuadas para hibridación in situ de un producto génico de miR dado a partir de las secuencias de ácidos nucleicos que se proporcionan en la Fig. 2, tal como se ha descrito anteriormente.

Una técnica adecuada para medir simultáneamente el nivel de expresión de múltiples productos génicos de miR en una muestra es un método basado en micromatrices, de alto rendimiento. Dicha técnica se pueden usar, por ejemplo, para determinar el nivel de expresión de las transcripciones de todos los genes conocidos de miR correlacionadas con cáncer. Dicho método implica la construcción de una oligoteca, en formato microchip (es decir, una micromatriz), que contiene un conjunto de oligonucleótidos sonda que son específicos para un conjunto de genes que miR. Usando dicha micromatriz, el nivel de expresión de múltiples microARN en una muestra biológica se determina por transcripción inversa de los ARN para generar un conjunto de oligonucleótidos diana, e hibridarlos con oligonucleótidos sonda en la micromatriz para generar un perfil de hibridación, o de expresión. A continuación, el perfil de hibridación de la muestra de ensayo se puede comparar con el de una muestra de control para determinar que microARN tiene un nivel de expresión alterada en cáncer de páncreas o células precancerosas. En un ejemplo, la oligoteca contiene sondas que corresponden con todos los miR conocidos a partir del genoma humano. La micromatriz se puede ampliar para incluir miARN adicionales a la vez que se descubren. La matriz puede contener dos sondas de oligonucleótidos diferentes para cada miARN, una que contiene la secuencia activa del miR maduro y la otra que es específica para el precursor de miR. La matriz también puede contener controles para condiciones de hibridación rigurosas. Un ejemplo de una técnica de micromatriz para detectar miARN se describe en la Solicitud de

PAT de Estados Unidos N° 2005/0277139.

También se puede determinar el nivel de productos génicos de miR usando un ensayo que detectan número de copias del gen de miR que codifica el producto génico de miR. La presencia de un gen de miR, que ha experimentado amplificación en tumores, se evalúa por determinación del número de copias de los genes de miR, es decir, el número de secuencias de ADN en una célula que codifica a los productos génicos de miR. Generalmente, una célula diploide normal tiene dos copias de un gen autosómico dado. Sin embargo, el número de copias se puede aumentar por amplificación o duplicación genética, por ejemplo, en células cancerosas, o reducir por supresión. Los métodos para evaluar el número de copias de un gen en particular son bien conocidos en la técnica, e incluyen, entre otros, ensayos basados en hibridación amplificación.

Se puede usar cualquiera de un número de ensayos basados en hibridación para detectar el número de copias de un gen de miR en las células de una muestra biológica. Uno de dichos métodos es el análisis de transferencia de Southern (véase Ausubel, et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1995; Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2ª Ed.), en el que el ADN genómico por lo general se fragmenta, se separa por electroforesis, se transfiere una membrana, y posteriormente se hibrida con una sonda específica de genes de miR. La comparación de la intensidad de la señal de hibridación desde la sonda para la región diana con una señal a partir de control desde una región de ADN genómico de una sola copia, sin amplificar normal en el mismo genoma proporciona una estimación del número de copias relativas de genes de miR, que corresponden con la sonda específica usada. Una señal aumentada en comparación con el control representa la presencia de amplificación.

Una metodología para determinar el número de copias de los genes de miR en una muestra es la hibridación in situ, por ejemplo, hibridación in situ con fluorescencia (FISH) (véase Angerer, 1987 Meth. Enzymol., 152: 649). Generalmente, la hibridación in situ comprende las siguientes etapas principales: (1) fijación de tejido o estructura biológica a analizar; (2) tratamiento de hibridación previa de la estructura biológica para aumentar la accesibilidad del ADN diana, y para reducir la unión no específica; (3) hibridación de la mezcla de ácidos nucleicos al ácido nucleico en la estructura o tejidos biológicos; (4) lavados posteriores a la hibridación para retirar fragmentos de ácidos nucleicos no unidos en la hibridación, y (5) detección de los fragmentos de ácidos nucleicos hibridados. Las sondas usadas en dichas aplicaciones por lo general están marcadas, por ejemplo, con radioisótopos o indicadores fluorescentes. Las sondas adecuadas son lo suficientemente largas, por ejemplo, de aproximadamente 50, 100, o 200 nucleótidos a aproximadamente 1000 o más nucleótidos, para permitir la hibridación específica con el ácidos o ácidos nucleicos diana en condiciones rigurosas.

Otra metodología alternativa para determinar el número de copias de ADN es la hibridación genómica comparativa (CGH). En los métodos de hibridación genómica comparativa, una colección de "ensayo" de ácidos nucleicos se marca con una primera marca, mientras que una segunda colección (por ejemplo, de una célula o tejido normal) se marca con una segunda marca. La relación de hibridación de los ácidos nucleicos se determina con la relación de la primera y la segunda marcas acaba fibra en una matriz. Las diferencias en la relación de las señales a partir de las dos marcas, por ejemplo, debido a amplificación genética en la colección de ensayo, se detecta y la relación proporciona una medida del número de copias de genes de miR, que corresponden con la sonda específica usada. Una representación citogenética de la variación del número de copias de ADN se puede generar por CGH, que proporciona relaciones de fluorescencia junto con la longitud de los cromosomas a partir de ADN de ensayo marcado diferencialmente y genómico de referencia.

Protocolos de hibridación adecuados para su uso con los métodos de la invención se describen, por ejemplo, en Albertson (1984) EMBO J. 3:1227-1234; Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 9138-9142; N° de Pub. de EPO 430:402; Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In Situ Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (1994).

Además, se pueden usar ensayos basados en amplificación para medir el número de copias de genes de miR. En dichos ensayos, las secuencias correspondientes de ácidos nucleicos de miR actúan como una matriz en una reacción de amplificación (por ejemplo, PCR). En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de amplificación será proporcional a la cantidad de matriz en la muestra original. La comparación con controles apropiados proporciona una medida del número de copias de los genes de miR, que corresponden con la sonda usada, de acuerdo con los principios que se han analizado anteriormente. Los métodos de PCR cuantitativa en tiempo real que usan sondas TaqMan son bien conocidos en la técnica. Se proporcionan protocolos detallados para PCR cuantitativa en tiempo real, por ejemplo, en: Heid et al., 1996, Real time quantitative PCR. Genome Res., 10: 986-994.

Además, se puede usar un ensayo basado en TaqMan para cuantificar polinucleótidos de miR. Los ensayos basados en TaqMan usan una sonda de oligonucleótidos fluorogénicos que contiene tintes fluorescentes en el sentido 5' y un agente de inactivación en el sentido 3'. La sonda hibrida con un producto de PCR, pero por sí misma no se puede ampliar debido a un agente de bloqueo en el extremo 3'. Cuando el producto de PCR se amplifica en ciclos posteriores, la actividad de la nucleasa en el sentido 5' de la polimerasa, por ejemplo, AmpliTaq, da como resultado la escisión de la sonda TaqMan. Esta escisión separa el tinte fluorescente en el sentido 5' y el agente de

inactivación en el sentido 3', dando como resultado, de este modo, un aumento de la fluorescencia como una función de la amplificación (véase, por ejemplo, <http://www2.perkin-elmer.com>).

Otros ejemplos de métodos adecuados de amplificación incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de ligasa (LCR) (véase, Wu y Wallace, *Genomics*, 4: 560, 1989; Landegren et al., *Science*, 241: 1077, 1988; y Barringer et al., *Gene*, 89:117, 1990), creación de la transcripción (Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1173, 1989), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., *Proc Nat Acad Sci, USA* 87: 1874, 1990), PCR puntual, y PCR de adaptadores de conectores.

Un método potente para determinar el número de copias de ADN usa plataformas basadas en micromatrices. Se puede usar tecnología de micromatriz porque ofrece alta resolución. Por ejemplo, la CGH tradicional tiene generalmente una resolución de formación de mapas limitada de 20 Mb; mientras que en una CGH basada en micromatrices, las relaciones de fluorescencia de los ADN genómicos de ensayo y de referencia marcados diferencialmente proporcionan una medida de sitio a sitio de la variación del número de copias de ADN, consiguiendo de este modo una mayor resolución de formación de mapas. Se pueden encontrar detalles de diversos métodos de micromatriz en la bibliografía. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.232.068; Pollack et al., *Nat. Genet.*, 23 (1): 41-6, (1999) y otros.

Tal como se usa el presente documento, "oligonucleótido sonda" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con un oligonucleótido diana. "Oligonucleótido diana" se refiere a una molécula o secuencia a detectar (por ejemplo, a través de hibridación). Por "oligonucleótido sonda específico de miR" o "oligonucleótido sonda específico para un miR" se hace referencia a un oligonucleótido sonda que tiene una secuencia seleccionada para hibridarse con un producto génico de miR específico, o con una transcripción inversa del producto génico de miR específico.

Un "perfil de expresión" o "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 que se expresa del mismo modo, la evaluación de un número de genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión genética que es único para el estado de la célula. Es decir, el tejido normal se puede distinguir del tejido de cáncer de páncreas, tejido de pancreatitis o "tejido benigno" obtenido a partir de una parte no cancerosa de un páncreas del sujeto adyacente al tejido canceroso. Por comparación de perfiles de expresión de tejido pancreático en diferentes estados, se obtiene información con respecto a que genes son importantes (incluyendo regulación de genes tanto positiva como negativa) en cada uno de estos estados. La identificación de secuencias que se expresan de forma diferencial en tejido de cáncer de páncreas o tejido pancreático normal, así como la expresión diferencial que da como resultado diferentes resultados de diagnóstico, permite el uso de esta información en número de formas. Por ejemplo, se puede evaluar un régimen de tratamiento en particular (por ejemplo, para determinar si un fármaco quimioterapéutico actúa para mejorar el diagnóstico largo plazo en un paciente en particular). De forma análoga, se puede hacer o confirmar el diagnóstico por comparación de muestras del paciente con los perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión genética (o genes individuales) permiten la identificación sistemática de candidatos a fármaco que suprimen el perfil de expresión de cáncer de páncreas o convierte en un mal perfil de diagnóstico en un perfil de diagnóstico mejor.

Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos diana del producto génico de miR a detectar puede ser: (a) una parte de, o toda la secuencia del miARN maduro; (b) una parte de, o toda la secuencia en horquilla del precursor de miARN; o (c) una parte de, o toda la secuencia del pri-miARN; (d) el complemento de las secuencias (a)-(c); o (f) una secuencia que es básicamente idéntica a las secuencias (a)-(d). (Véase la Fig. 1). Un ácido nucleico básicamente idéntico puede tener una identidad de secuencia mayor que un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % con la secuencia diana.

En un ejemplo de la invención, el nivel de productos génicos de miR se detecta mediante formación de perfiles de precursores de miARN en muestras de ensayo de biopsia del tejido pancreático humano o de células de páncreas. Las secuencias de 201 productos génicos de miR perfilados se proporcionan en la Fig. 2. En el presente documento, todas las secuencias de ácidos nucleicos se proporcionan en el sentido 5' a 3'. Además, los genes se representan en cursiva, y los productos génicos se representan con fuente normal; por ejemplo, *mir-17* es el gen y miR-17 es el producto génico. Los celadores usados para amplificar los precursores de miARN humanos se muestran en la Fig. 4.

En otro ejemplo, el nivel de productos génicos de miR se detecta mediante formación de perfiles de miARN maduros en muestras de ensayo de biopsia de cáncer de páncreas humano o tejido benigno. Las secuencias de los productos génicos de miR maduros perfilados se proporcionan en las Figuras 13 y 16.

En otro ejemplo, la expresión del miARN maduro, activo se evalúa usando transferencia de Northern.

En otro ejemplo, se usa PCR in situ de transcripción inversa para localizar tres de los miARN principales expresados de forma diferencial en células de tumor pancreático.

Además se contempla un kit para diagnosticar cáncer de páncreas en un sujeto que se sospecha que padece, o que está en riesgo de desarrollar, cáncer de páncreas. Dicho kit puede incluir: (a) un medio para medir el nivel de al

menos un producto génico de miR en una muestra biológica procedente del páncreas del sujeto, y (b) un medio para comparar el nivel del producto génico de miR en la muestra biológica con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control. Por consiguiente, una diferencia detectada entre el nivel del producto génico de miR en la muestra biológica en comparación con el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra de control es indicativo de que el sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, cáncer de páncreas.

Además de diagnosticar si un sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, cáncer de páncreas, la presente divulgación contempla métodos para tratar sujetos que tienen una expresión alterada de productos génicos de miR específicos de cáncer de páncreas. Sin el deseo de quedar ligado por ninguna teoría, se cree que alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos de miR en células puede dar como resultado la desregulación de una o más dianas previstas para estos miR, que pueden llevar a la formación de cáncer. Por lo tanto, la alteración del nivel del producto génico de miR específico de cáncer (por ejemplo, por disminución del nivel de un producto génico de miR que está regulado de forma positiva en células cancerosas, y/o por aumento del nivel de un producto génico de miR que está regulado de forma negativa en células cancerosas) puede tratar de forma satisfactoria el cáncer de páncreas.

Por consiguiente, la presente divulgación incluye métodos para tratar el cáncer de páncreas en un sujeto, en el que al menos un producto génico de miR específico de cáncer de páncreas está desregulado (por ejemplo, regulado de forma negativa, regulado de forma positiva) en las células cancerosas del sujeto. Cuando el producto génico de miR está regulado de forma negativa en las células cancerosas de páncreas, el método comprende administrar una cantidad eficaz del producto génico de miR de modo que la progresión del cáncer en el sujeto se inhibe. Cuando el producto génico de miR está regulado de forma positiva en las células cancerosas, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del gen de miR regulado de forma positiva, denominados en el presente documento con puestos para inhibición de la expresión del gen de miR, de modo que la progresión del cáncer en el sujeto se inhibe.

Los términos "que inhibe la progresión" del cáncer o "que trata" cáncer se refieren a detener por ralentizar la formación, desarrollo, o crecimiento de cáncer y eliminación o reducción de síntomas de cáncer, que incluyen invasión y/o metástasis. Dicho tratamiento incluye provocar diferenciación adicional de células cancerosas.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un producto génico de miR aislado una cantidad suficiente para inhibir la progresión de cáncer en un sujeto que padece cáncer de páncreas. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un producto génico de miR a administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores, tales como la talla y el peso del sujeto; el grado de 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 de un producto génico de miR aislado se puede basar en el peso aproximado de una masa tumoral a tratar. El peso aproximado de una masa tumoral se puede determinar calculando el volumen aproximado de la masa, en el que un centímetro cúbico de volumen es más o menos equivalente a un gramo. Una cantidad eficaz del producto génico de miR aislado basada en el peso de una masa tumoral puede estar en el intervalo de aproximadamente 10-500 microgramos/gramo de masa tumoral. En determinadas realizaciones, la masa tumoral puede ser de al menos aproximadamente 10 microgramos/gramo de masa tumoral, al menos aproximadamente 60 microgramos/gramo de masa tumoral o al menos aproximadamente 100 microgramos/gramo de masa tumoral.

Una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado también se puede basar en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto a tratar. Dichas cantidades eficaces se pueden administrar por vía parenteral o por vía enteral, tal como se describe en el presente documento.

Un experto en la materia también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiados 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 días a varios meses, particularmente 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 múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz de producto génico de miR administrada al sujeto puede comprender la cantidad total de producto génico administrada 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 altera por retirar del estado natural a través de intervención humana. Por ejemplo, se considera que un producto génico de miR sintético, o un producto génico de miR parcialmente completamente separado de los materiales que coexisten en 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 se ha administrado el producto génico de miR.

Los productos génicos aislados pueden ser oligonucleótidos que comprenden el producto génico de miR maduro funcional, oligonucleótidos que comprenden la horquilla corta de precursores de miARN que contienen la parte en

bucle de la horquilla, precursores de miARN duplex que carecen de la horquilla, o vectores que expresan dichas moléculas. Por lo tanto, un producto génico de miR que se administra deliberadamente a, o se expresa en, una célula se considera un producto génico de miR "aislado". También se considera que un producto génico de miR producido dentro de una célula a partir de una molécula precursora de miR es una molécula "aislada".

5 En algunas realizaciones, los productos génicos de miR aislados incluyen uno o más de los siguientes: MIR-092-2-P, MIR-096-P, MIR-129-2, MIR-133b, MIR-139, MIR-188b-P, MIR-204, MIR-299-P, MIR-337, MIR-371, MIR-383, MIR-375.

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

20 Un producto génico de miR aislado se puede administrar como ARN desnudo, en conjunto con un agente de administración. Como alternativa, el producto génico de miR se puede expresar a partir de un plásmido de ADN circular o lineal recombinante usando cualquier promotor adecuado. Promotores adecuados para expresar 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
25 expresión de los productos génicos de miR en células cancerosas.

Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes 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
30 células cancerosas. El uso de plásmidos recombinantes para administrar los productos génicos de miR a células cancerosas se analiza con más detalle a continuación.

Los productos génicos de miR se pueden expresar a partir un plásmido recombinante separado, o se pueden expresar a partir del mismo plásmido recombinante. En una realización, los productos génicos de miR se expresan como moléculas precursoras de ARN a partir de un solo plásmido, y las moléculas precursoras se procesan en el producto génico de miR maduro funcional mediante un sistema de procesamiento adecuado, que incluye, pero no se limita a, sistemas de procesamiento que existen 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 et al.) y el sistema de
35 ARNasa III de *E. coli* (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2004/0014113 de Yang et al.).

La selección de pasillos adecuados para la expresión de los productos génicos de miR, métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos en el plásmido para expresar los productos génicos, y métodos para administrar el plásmido recombinante a las células de interés están dentro de la experiencia en la materia. Véase, por ejemplo, Zeng et al. (2002), *Molecular Cell* 9:1327-1333; Tuschl (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 446-448; Brummelkamp et al. (2002), *Science* 296: 550-553; Miyagishi et al. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 497-500; Paddison et al. (2002), *Genes Dev.* 16: 948-958; Lee et al. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 500-505; y Paul et al. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 505-508.

50 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 temprano intermedio de CMV. Tal como se usa 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 unidas de forma operativa al promotor, de forma que el promotor puede iniciar la transcripción del producto génico de miR que codifica secuencias.

55 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 puede expresar directamente en células cancerosas. El uso de vectores virales recombinantes para administrar los productos
60 génicos de miR a células cancerosas se analiza con más detalle a continuación.

Los vectores virales recombinantes de la invención comprenden secuencias que codifican los productos génicos de miR y cualquier promotor adecuado para expresar las secuencias de ARN. Promotores adecuados 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 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 que derivan 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 virales se puede modificar mediante pseudotipado de los vectores con proteínas de envoltura otros antígenos de superficie a partir de otros virus, o por sustitución de diferentes proteínas de la cápside viral, cuando sea apropiado.

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

La selección de vectores virales recombinantes adecuados para su uso 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 están dentro de la experiencia en la materia. Véase, por ejemplo, Domburg (1995), Gene Therap. 2: 301-310; Eglitis (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller (1990), Hum. Gene Therap. 1: 5-14; y Anderson (1998), Nature 392: 25-30.

Son vectores virales adecuados los obtenidos a partir de AV y AAV. Un vector de AV adecuado para expresar los productos génicos de miR, un método para construir el vector de AV recombinante, y un método para administrar el vector en células diana, se describen en Xia et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010.

Vectores de AAV adecuados para expresar los productos génicos de miR, de todos para construir el vector de AAV recombinante, y métodos para administrar los vectores en células diana se describen en Samulski et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher et al. (1996), J. Virol., 70: 520-532; Samulski et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; Patente de Estados Unidos Nº 5.252.479; Patente de Estados Unidos Nº 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional Nº WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional Nº WO 93/24641.

En una realización, los productos génicos de miR se expresan a partir de un solo vector de AAV recombinante que comprende el promotor temprano intermedio del CMV.

En una realización, un vector viral de AAV recombinante de la invención comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un ARN precursor de miR en conexión operable con una secuencia determinación de poliT bajo el control de un promotor de ARN U6 humano. Tal como se usa en el presente documento, "en conexión operable con una secuencia determinación de poliT" significa que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las hebras sentido o antisentido son inmediatamente adyacentes a la señal de terminación de poliT en el sentido 5'. Durante la transcripción de las secuencias de miR desde el vector, las señales de terminación de poliT actúan para terminar la transcripción.

Otro método para alterar los niveles de expresión de miARN en cáncer de páncreas es a través de sucesos epigenéticos tales como hiper- o hipo- metilación de los promotores de genes de miARN. La hipermetilación del promotor dará como resultado una expresión reducida del gen de miARN y la hipometilación del promotor dará como resultado una expresión aumentada del gen de miARN. (Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. 3: 415-28 (2005)). Por lo tanto, otro método para inhibir la progresión del cáncer es la administración de un compuesto que causa hipometilación de la región promotora de un producto génico de miR regulado de forma negativa.

En otras realizaciones que los métodos de tratamiento de la invención, también se puede administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto que inhibe la expresión de miR. Tal como se usa en el presente documento, "que inhibe la expresión de miR" significa que la producción de la forma madura, activa de producto 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 transcripción de miR que sea analizada anteriormente para el método de diagnóstico. La inhibición se puede producir al nivel de expresión genética (es decir, mediante inhibición de la transcripción de un gen de miR que codifica el producto génico de miR) o al nivel de procesamiento (por ejemplo, por inhibición del 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 progresión de cáncer en un sujeto que padece cáncer de páncreas. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la expresión de miR a administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores, tales como la talla y el peso del sujeto; el grado de 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 que inhibe la expresión se puede basar en el peso aproximado de una masa tumoral a tratar. El peso aproximado de una masa tumoral se puede determinar calculando el volumen aproximado de la masa, en el que un centímetro cúbico de volumen es más o menos equivalente a un gramo. Una cantidad eficaz basada en el peso de una masa tumoral puede estar entre aproximadamente 10-500 microgramos/gramo de masa tumoral, al menos aproximadamente 10 microgramos/gramo de masa tumoral, al menos aproximadamente 60 microgramos/gramo de masa tumoral, y al menos aproximadamente 100 microgramos/gramo de masa tumoral.

Una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la expresión de miR también se puede basar en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto a tratar. Dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o por vía enteral, entre otras, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz del compuesto que inhibe la expresión administrada a un sujeto puede variar de aproximadamente 5-3000 microgramos/kg de peso corporal, de aproximadamente 700 - 1000 microgramos/kg de peso corporal, o puede ser mayor que aproximadamente 1000 microgramos/kg de peso corporal.

Un experto en la materia también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiada para administrar un compuesto que inhibe la expresión de miR a un sujeto dado. Por ejemplo, un compuesto que inhibe la expresión se puede administrar al sujeto una vez (por ejemplo, en forma de una sola inyección o deposición). Como alternativa, un compuesto que inhibe la expresión se puede administrar una o dos veces al día a un sujeto durante un periodo de aproximadamente unos pocos días a unos pocos meses, de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, o de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación en particular, un compuesto que inhibe la expresión se administra una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz del compuesto que inhibe la expresión administrado sujeto puede comprender la cantidad total de compuesto administrado durante todo el régimen de dosificación.

En algunas realizaciones, los productos génicos de miR cuyos niveles se pueden reducir incluyen uno o más de los siguientes: let-7a-2-P, let-7b, let-7c, let-7d, let-7f-1, let-7i, MIR-001-2, MIR-007-1, MIR-015a, MIR-015b, MIR-016-1, MIR-019b-1-P, MIR-021, MIR-023a, MIR-024-1,2, MIR-027a, b, MIR-029a,c, MIR-030d, MIR-032, MIR-092-1, MIR-098, MIR-099a, MIR-100, MIR-107, MIR-125b-1, MIR-126, MIR-128a, MIR-132, MIR-136, MIR-142-P, MIR-145-P, MIR-152, MIR-155, MIR-181a,c, MIR-196a-2, MIR-212, MIR-213, MIR-215, MIR-218-1,2, MIR-221, MIR-222-P, MIR-301, MIR-328, MIR-331-P, MIR-345, MIR-367, MIR-376, MIR-424.

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, moléculas de ARN enzimático tales como ribozimas, o moléculas capaces de formar una triple hélice con el gen de miR. Otra clase de compuestos inhibidores pueden causar hiper-metilación del promotor del producto génico de miR, dando como resultado una expresión reducida del gen de miR. Cada uno de estos compuestos se puede dirigir a un producto génico de miR dado para destruir, inducir la destrucción de, o de otro modo reducir el nivel del producto génico de miR diana.

Por ejemplo, la expresión de un gen de miR dado se puede inhibir induciendo interferencia de ARN del gen de miR con una molécula de ARN bicatenario aislado ("dsARN") que tiene una homología de secuencia de al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 %, 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 con una longitud de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos, o con una longitud de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos. El siARN comprende una hebra de ARN sentido y una hebra de ARN antisentido complementaria y piratas en conjunto mediante interacciones convencionales de emparejamiento de bases de Watson-Crick (en lo sucesivo en el presente documento "bases emparejadas"). La hebra sentido comprende la secuencia de ácidos nucleicos que es básicamente idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos contenidas 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 contenida dentro del mARN diana es una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntica a la secuencia diana, o 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 tienen bases emparejadas y están unidas de forma covalentes mediante un área de "horquilla" bicatenaria.

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

El siARN también se puede someter a ingeniería para contener determinadas propiedades "de tipo fármaco". Dichas modificaciones incluyen modificaciones químicas para la estabilidad y conjugación de colesterol para administración. Dichas modificaciones transmiten mejores propiedades farmacológicas al siARN y usando dichas modificaciones, los siARN farmacológicamente activos pueden conseguir una amplia biodistribución y silenciamiento eficaz de los miARN en la mayoría de los tejidos in vivo.

Una o ambas hebras del siARN también pueden comprender un saliente en el sentido 3'. Tal como se usa en el presente documento, un "saliente en el sentido 3'" se refiere a al menos un nucleótido no emparejado que se extiende del extremo en el sentido 3' de una hebra de ARN de doble cara. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el siARN comprende al menos un saliente en el sentido 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, el saliente en el sentido 3' está presente en ambas hebras del siARN, y tiene 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra del siARN puede comprender salientes en el sentido 3' de ácidos ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

El siARN se puede producir químicamente 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 de miR aislados. 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 et al..

Métodos para sintetizar y validar un siARN terapéuticamente eficaz sometido a ingeniería para silenciar miARN in vivo se describe en Krutzfeldt J, et al. (2005), Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs', Nature 438 (7068): 685-9.

La expresión de un gen de miR dado también se puede inhibir mediante 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 al ARN diana por medio de interacciones de ARN-ARN o ARN-ADN o ARN-ácido péptido nucleico, que alteran la actividad del ARN diana. Ácidos nucleicos antisentido adecuados para su uso en los presentes métodos son ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ARN, ADN, quimeras de ARN-ADN, APN) 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 % con una secuencia de ácidos nucleicos contigua en un producto génico de miR. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que los ácidos nucleicos antisentido activan la RNasa H u otra nucleasa celular que digiere el producto génico de miR/duplex de ácido nucleico antisentido.

Por ejemplo, en eucariotas, la ARN polimerasa catalizada la transcripción de un gen estructural para producir mARN. Una molécula de ADN se puede diseñar para contener una matriz de ARN polimerasa en la que la transcripción de ARN en una secuencia que es complementaria con la de un mARN preferente. La transcripción de ARN se denomina "ARN antisentido". Las moléculas de ARN antisentido pueden inhibir la expresión del mARN (por ejemplo, Rylova et al., Cancer Res, 62 (3): 801-8, 2002; Shim et al., Int. J. Cancer, 94 (1): 6-15, 2001).

Como alternativa, con respecto a una primera molécula de ácido nucleico, una segunda molécula de ADN o una segunda molécula de ácido nucleico quimérico y se crea con una secuencia, que es una secuencia complementaria homóloga a la secuencia complementaria de la primera molécula o partes de la misma, se denomina el "ARN antisentido o señuelo de ADN o molécula de señuelo" de la primera molécula. El término "molécula de señuelo" también incluye una molécula de ácido nucleico, que puede ser mono o bicatenario, que comprende ADN o APN (ácido péptido nucleico) (Mischiati et al., Int. J. Mol. Med., 9 (6): 633-9, 2002), y que contiene una secuencia de un sitio de unión a proteínas, tal como sitios de unión para una proteína reguladora o un sitio de unión para un factor de transcripción. En la técnica se conocen aplicaciones de moléculas de ácido nucleico antisentido, que incluyen moléculas de ADN antisentido y de ADN de señuelo, por ejemplo, Morishita et al, Ann. N Y Acad. Sci., 947: 294-301, 2001; Andratschke et al., Anticancer Res, 21: (5) 3541-3550, 2001.

Los ácidos nucleicos antisentido también pueden contener modificaciones en la estructura principal del ácido nucleico o en los restos de azúcar y bases (o sus equivalentes) para potenciar 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 duplex, tales como acridina, o uno o más grupos resistentes a nucleasas.

Los ácidos nucleicos antisentido se pueden producir químicamente 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 de miR aislados. 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 et al..

La expresión de un gen de miR dado también se puede inhibir mediante un ácido nucleico enzimático. Tal como se usa el presente documento, un "ácido nucleico enzimático" se refiere a un ácido nucleico que comprende una región de unión a sustratos que tiene una complementariedad con una secuencia de ácidos nucleicos contigua de un producto génico de miR, y que es capaz de escindir específicamente el producto génico de miR. La región de unión a sustratos 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 de ácidos nucleicos contigua 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 a los presentes métodos es una ribozima.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la escisión específica de ARN. Se proporciona una revisión en Rossi, Current Biology, 4: 469-471 (1994). El mecanismo de una acción de ribozima implica hibridación específica de secuencias de la molécula de ribozima con ARN diana complementario, seguido de una escisión endonucleolítica. Una composición de moléculas de ribozima debe incluir una o más secuencias complementarias con el mARN del gen diana, y deben incluir una secuencia catalítica bien conocida responsable de la escisión del mARN (Patente de Estados Unidos N° 5.093.246).

Los sitios de escisión de ribozima específica dentro de cualquier diana de ARN potencial se identifican inicialmente por exploración de la molécula de interés para sitios de escisión de ribozima que incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez que se han identificado, secuencias de ARN corto de entre 15 y 20 ribonucleótidos que corresponden con la región del gen de miR que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar para características estructurales pronosticadas, por ejemplo, estructura secundaria, que pueden hacer que una secuencia de oligonucleótidos sea inadecuada. La idoneidad de secuencias candidatas tales se puede evaluar sometiendo a ensayo su accesibilidad a hibridación con oligonucleótidos complementarios, usando ensayos de protección de ribonucleasa.

Los ácidos nucleicos enzimáticos se pueden producir químicamente biológicamente, o se pueden expresar a partir de un plásmido recombinante o vector viral, tal como se ha descrito anteriormente para los productos génicos de miR aislados. 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 et al. (1999), Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 9:25-31; y Patente de Estados Unidos N° 4.987.071 de Cech et al..

Se pueden usar moléculas que forman triple hélice para reducir el nivel de la actividad genética de miR diana. Las moléculas de ácido nucleico que se pueden asociar entre sí en una conformación de tricatena (triple hélice) y que por lo tanto se pueden usar para inhibir la traducción de un gen diana, deberían ser hélices individuales compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de forma que se promueva la formación de la triple hélice mediante las reglas formación de pares de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren tramos considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de un duplex. Las secuencias de nucleótidos pueden ser a base de pirimidina, que darán como resultado tripletes de TAT y CGC a través de las tres hebras asociadas de la triple hélice resultante. Las moléculas ricas en pirimidina proporcionan bases complementarias con una región rica en purina de una sola hebra del duplex en una orientación paralela a la de la hebra. Además, se pueden elegir moléculas de ácido nucleico que sean ricas en purina, por ejemplo, las que contienen un tramo de restos de G. Estas moléculas formarán una triple hélice con un duplex de ADN que es rico en pares de GC, en las que la mayoría de los restos de purina están localizados en una sola hebra del duplex al que se dirige, dando como resultado tripletes de GGC a través de las tres hebras en el triplete. Como alternativa, las secuencias potenciales que se pueden dirigir para la formación de triple hélice se pueden aumentar mediante la creación de una molécula de ácido nucleico denominada "switchback". Las moléculas de Switchback se sintetizan de una forma alternante en las direcciones 5'-3', 3'-5', de modo que forman pares de bases con una primera hebra de un duplex y a continuación con la otra, eliminando la necesidad de un tramo considerable de purinas o pirimidinas en una hebra de un duplex.

Otro método para alterar los niveles de expresión de miARN en cáncer de páncreas es a través de sucesos epigenéticos tales como hiper- o hipo- metilación de los promotores de genes de miARN. La hiper metilación del promotor dará como resultado expresión reducida del gen de miARN y la hipometilación del promotor dará como resultado la expresión aumentada del gen de miARN. (Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. 3: 415-28 (2005)).

La administración de al menos un producto génico de miR, o al menos un compuesto para inhibir la expresión de miR, inhibirá la progresión de cáncer de páncreas en un sujeto. 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 de los productos génicos de miR o compuestos que inhiben la expresión genética de miR. Una

inhibición de la 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 un 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 por métodos inmunohistológicos, citometría de flujo, otras técnicas diseñadas de detectar marcadores de superficie característicos de células cancerosas.

El tamaño de una masa tumoral se puede determinar por observación visual directa, o por métodos diagnósticos por formación de imágenes, tales como rayos X, formación de imágenes por resonancia magnética, ecografía, y gammagrafía. Los métodos de diagnóstico por 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 mediante métodos físicos, tales como palpación de la masa de tejido con un instrumento de medida, tal como un calibrador.

Los productos génicos de miR o compuestos que inhiben la expresión genética de miR se pueden administrar a un sujeto mediante cualquier medio adecuado para la administración de estos compuestos a células cancerosas del sujeto. Por ejemplo, los productos génicos de miR o compuestos que inhiben 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 a estos compuestos. En una realización, las células se transfectan con un vector plásmido o viral que comprende secuencias que codifican al menos un producto génico de miR o compuesto que inhibe la expresión genética de miR.

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

Por ejemplo, se pueden transfectar células 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 LIPOFECTIN. 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 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 células.

En una realización, las células cancerosas de páncreas se aíslan del sujeto, se transfectan con ácidos nucleicos que codifican el producto génico de miR regulado de forma negativa, y se vuelven a introducir en el sujeto.

Un producto génico de miR o compuesto que inhibe la expresión genética de miR también se puede administrar a un sujeto mediante cualquier vía de administración enteral o parenteral. Las vías de administración enteral adecuadas para los presentes métodos incluyen, por ejemplo, administración oral, rectal, o intranasal. Las vías de administración parenteral adecuadas incluyen, por ejemplo, administración intravascular (por ejemplo, inyección intravenosa en bolo, infusión intravenosa, inyección intraarterial en bolo, infusión intraarterial e instilación por catéter en el sistema vascular); inyección peri- e intratisular (por ejemplo, inyección peritumoral e intratumoral, inyección intraretiniana, o inyección subretiniana); inyección o deposición 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 en la retina o un supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso, o gelatinoso); e inhalación. Son vías de administración adecuadas inyección, infusión e inyección directa en el tumor.

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

En el presente documento se analizan plásmidos recombinantes y vectores virales que comprenden secuencias que expresan los productos génicos de miR o compuestos inhiben la expresión genética de miR, y técnicas para administrar dichos plásmidos y vectores a células cancerosas.

En una realización, los liposomas se usan para administrar un producto génico de miR o compuesto que inhibe 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 de sangre de los productos génicos o ácidos nucleicos. Los liposomas adecuados para uso en la invención se pueden formar a partir de lípidos que forman vesículas convencionales, que generalmente incluyen fosfolípidos cargados de forma neutra o negativa y un esteroles, tal como

colesterol. La selección de lípidos generalmente está guiada por 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 et al. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467; y Patentes de Estados Unidos N° 4.235.871, N° 4.501.728, N° 4.837.028, y N° 5.019.369.

5 Los liposomas para uso en los presentes métodos pueden comprender una molécula de ligando que dirige el liposoma a células cancerosas. Son adecuados y tantos que se unen a receptores predominantes en células cancerosas, tales como anticuerpos monoclonales que unen a antígenos de células tumorales.

10 Los liposomas para uso en los presentes métodos también se puede modificar con el fin de evitar el aclaramiento por el sistema de macrófagos mononucleares ("MMS") y sistema del retículo endotelial ("RES"). Dichos liposomas modificados tienen restos de inhibición de la opsonización en la superficie o incorporados en la estructura del liposoma. En algunas realizaciones, un liposoma de la invención puede comprender restos tanto de inhibición de opsonización como un ligando.

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

25 Los restos de inhibición de la opsonización adecuados para modificar liposomas incluyen polímeros solubles en agua con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 daltons, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 daltons. Dichos polímeros incluyen derivados de polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG); por ejemplo, metoxi PEG o PPG, y estearato de PEG o PPG; polímeros sintéticos, tales como poliacrilamida o poli N-vinil pirrolidona; poliamidoaminas lineales, ramificadas, o
30 dendríméricas; ácidos poliacrílicos; polialcoholes, por ejemplo, alcohol de polivinilo y polixilitol a los que están unidos químicamente grupos carboxílico o amino, así como gangliósidos, tal como gangliósido GM1. Además, son adecuados copolímeros de PEG, metoxi PEG, o metoxi PPG, o derivados de los mismos. Además, el polímero de inhibición de la opsonización puede ser un copolímero de bloque de PEG y un poliamino ácido, polisacáridos, poliamidoamina, polietilenamina, o polinucleótido. Los polímeros de inhibición de la opsonización también pueden
35 ser polisacáridos naturales que contienen aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péptico, ácido neuramínico, ácido algínico, carragenano; polisacáridos u oligosacáridos aminados (lineales ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por ejemplo, hechos reaccionar con derivados de ácidos carbónicos con unión resultante de grupos carboxílicos. El resto de inhibición de la opsonización puede ser un PEG, PPG, o derivados de los mismos. En ocasiones, los liposomas
40 modificados con derivados de PEG o PEG se denominan "liposomas PEGilado".

El resto de inhibición de la opsonización se puede unir a la membrana del liposoma mediante una cualquiera de numerosas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida de PEG se puede unir a un ancla de fosfatidil-etanolamina soluble en lípidos, y a continuación se puede unir a una membrana. De forma análoga, un
45 polímero de dextrano se puede derivatizar con un ancla de estearilamina soluble en lípidos 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 de inhibición de la opsonización permanecen en la circulación durante mucho
50 más tiempo que los liposomas sin modificar. Por esta razón, en ocasiones dichos liposomas se denominan liposomas "ocultos". Se sabe que los liposomas ocultos se acumulan en tejidos alimentados por microvasculatura porosa o de "fuga". Por lo tanto, la caracterización de tejidos mediante dichos defectos de microvasculatura, por ejemplo tumores sólidos, acumulará de forma eficaz estos liposomas; véase Gabizon, et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18:6949-53. Además, la absorción reducida por el RES reduce la toxicidad de los liposomas ocultos al
55 prevenir la acumulación significativa de los liposomas en el hígado y en el bazo. Por lo tanto, los liposomas que están modificados con restos de inhibición de la opsonización son muy adecuados para administrar los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión genética de miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a células tumorales.

60 Los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión genética de miR se pueden formular como composiciones farmacéuticas, denominadas en ocasiones "medicamentos", antes de administrar a los to un sujeto, de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Por consiguiente, la invención incluye composiciones farmacéuticas para tratar cáncer de páncreas. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico de miR aislado y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización en
65 particular, el producto génico de miR corresponde con un producto génico de miR que tiene un nivel de expresión disminuido en células cancerosas de páncreas con respecto a células de control adecuadas.

En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR. En una realización en particular, en al menos un compuesto de inhibición de la expresión genética de miR específico para un gen de miR cuya expresión es mayor en células cancerosas de páncreas que en células de control.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se caracterizan porque son al menos estériles y sin pirógenos. Tal como se usa en el presente documento, "composiciones" o "formulaciones" 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, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985).

Las presentes formulaciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto de 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 aceptables de los mismos, mezclados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender al menos un producto génico de miR o compuesto de 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.

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.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender al menos un producto génico de miR o compuesto de 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 por incorporación de uno o más ribonucleótidos que están modificados en la posición 2' en los productos génicos de miR. Ribonucleótidos modificados en la posición 2' adecuados incluyen los modificados en la posición 2' con flúor, amino, alquilo, alcoxi, y O-alilo.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. 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 quelato cálcico (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 uso en forma líquida, o se pueden liofilizar.

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, magnesio carbonato, y similares.

Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida para 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 de inhibición de la expresión genética de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican). Una composición farmacéutica para administración por aerosol (de 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 de inhibición de la expresión genética de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) encapsulado en un liposomas tal como se ha descrito anteriormente, y un agente propulsor. También se puede incluir un vehículo también cuando se desee; por ejemplo, lecitina para administración intranasal.

La invención también contempla un método para determinar la eficacia de un régimen terapéutico que inhibe la progresión del cáncer de páncreas en un sujeto. El método incluye: (a) obtener una primera muestra de ensayo del páncreas del sujeto que contiene células cancerosas con un producto génico de miR regulado de forma positiva con respecto a las células de control; (b) administrar el régimen terapéutico al sujeto; (d) obtener una segunda muestra de ensayo del páncreas del sujeto después de un período de tiempo; y (e) comparar los niveles del producto génico de miR regulado de forma positiva en la primera y la segunda muestras de ensayo. Un nivel menor del producto génico de miR de regulado de forma positiva en la segunda muestra de ensayo en comparación con la primera muestra de ensayo indica que el régimen terapéutico es eficaz para inhibir la progresión del cáncer de páncreas en el sujeto.

Otro método para determinar la eficacia de un régimen terapéutico que inhibe la progresión del cáncer de páncreas en un sujeto, incluye: (a) obtener una primera muestra de ensayo del páncreas del sujeto que contiene células cancerosas con un producto génico de miR regulado de forma negativa con respecto a células de control; (b)

administrar el régimen terapéutico al sujeto; (d) obtener una segunda muestra de ensayo del páncreas del sujeto después de un periodo de tiempo; y (e) comparar los niveles del producto génico de miR regulado de forma negativa en la primera y la segunda muestras de ensayo. En este caso, un nivel mayor del producto génico de miR regulado de forma negativa en la segunda muestra de ensayo en comparación con la primera muestra de ensayo indica que el régimen terapéutico es eficaz para inhibir la progresión del cáncer de páncreas en el sujeto.

La invención también incluye un método por identificar un agente anticáncer de páncreas. El método incluye: (a) determinar el nivel de expresión de al menos un producto génico de miR que está sobreexpresado en una muestra biológica que contiene células cancerosas de páncreas, generando de este modo datos para un nivel de expresión previo de ensayo de dicho producto génico de miR; (b) poner en contacto la muestra biológica con un agente de ensayo; (c) determinar el nivel de expresión del producto génico de miR en la muestra biológica después de la etapa (b), generando de este modo datos para un nivel de expresión posterior al ensayo; y (d) comparar el nivel de expresión posterior al ensayo con el nivel de expresión previo al ensayo de dicho producto génico de miR. Una disminución en el nivel de expresión posterior al ensayo del producto génico de miR sobreexpresado es indicativa de que el agente de ensayo tiene propiedades anticáncer de páncreas.

En otra realización, el método para identificar un agente anticáncer de páncreas, incluye: (a) determinar el nivel de expresión de al menos un producto génico de miR que está subexpresado en una muestra biológica que contiene células cancerosas de páncreas, generando de este modo datos para un nivel de expresión previo al ensayo de dicho producto génico de miR; (b) poner en contacto la muestra biológica con un agente de ensayo; (c) determinar el nivel de la expresión del producto génico de miR en la muestra biológica después de la etapa (b), generando de este modo datos para un nivel de expresión posterior al ensayo; y (d) comparar el nivel de expresión posterior al ensayo con el nivel de expresión previo al ensayo de dicho producto génico de miR, en el que un aumento en el nivel de expresión posterior al ensayo del producto génico de miR subexpresado es indicativo de que el agente de ensayo tiene propiedades anticáncer de páncreas.

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, de forma sintética, o se puede aislar (es decir, purificar) a partir de una fuente natural. En la técnica se conocen diversos métodos para proporcionar dichos agentes a una célula (por ejemplo, transfección), y varios de dichos métodos se han descrito anteriormente en el presente documento. Además, en la técnica se conocen bien de todos 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). 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:

Identificación de una firma de expresión de microARN que discrimina el cáncer de páncreas a partir de tejido normal o de pancreatitis

Se usó un ensayo de PCR cuantitativa, en tiempo real para formar perfiles de la expresión de más de 200 precursores de miARN en muestras de ensayo clínico de líneas celulares de cáncer de páncreas humano (adenocarcinoma), tejido benigno relacionado, páncreas normal, pancreatitis crónica y cáncer de páncreas. Se identificó una firma única de miARN que distinguía el cáncer de páncreas del páncreas normal y benigno. Los métodos usados para la RT-PCR cuantitativa en tiempo real se describen con detalle en Jiang, J., et al. (2005), Nucleic Acids Res 33: 5394-5403; Schmittgen T. D., et al. (2004), Nucleic Acids Res 32: E43; y Solicitud Provisional de Estados Unidos con N° de Serie 60/656.109, presentada el 24 de febrero de 2005. El procedimiento experimental y los resultados también se indicaron en Lee et al., (2006) Int. J. Cancer 120: 1046-1054.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de tejidos. Las muestras de tejido analizadas en este estudio se obtuvieron a partir de pacientes sometidos a un procedimiento quirúrgico para retirar una parte del páncreas en la Universidad de Oklahoma Health Sciences Center y la Universidad del Estado de Ohio. La toma de muestras se ajustaba a las normas y prácticas del Institutional Review Board de la instalación. Después de la retirada de la muestra de ensayo quirúrgica, el personal de investigación transporta inmediatamente el tejido al laboratorio de patología quirúrgica. La facultad de patología realizó un análisis bruto de la muestra de ensayo y seleccionó tejido pancreático que parecía canceroso y tejido pancreático que parecía normal para la investigación. Cada muestra se puso en un criovial y se congeló de forma ultrarrápida en nitrógeno líquido y se almacenó a -150 °C hasta el análisis. El análisis patológico posterior de los institutos que proporcionan las muestras de ensayo quirúrgicas confirmó la histopatológico de las muestras tomadas para investigación. Se realizó un segundo nivel de control de calidad en los tejidos benignos adyacentes en el laboratorio que realizó el análisis de ARN. Se prepararon láminas histológicas a partir de la sección del tejido congelado directamente adyacente al tejido a partir del que se aisló el ARN. Estas láminas fueron examinadas por

uno de nosotros (W.L.F.) para determinar si los tejidos benignos contenían cualquier célula de tumor pancreático. El tejido benigno que contenía tumor residual no se incluyó en el estudio. Los datos clínicos en las muestras de ensayo se indican en la Tabla Complementaria 1.

5 *Líneas celulares.* Las siguientes líneas celulares de tumor del páncreas se adquirieron en la madre su inicial Colección Americana de Tejidos Tipo (Manassas, VA). Panc-1, HS766T, MIA PaCa-2, HPAF-II, BxPC-3, Mpanc-96, PL45, Panc03.27 y Panc10.05. Las líneas celulares se cultivaron en medio de RPMI 1640 con FBS al 10 % u otro medio completo optimizado usando condiciones estándar.

10 *Formación de perfiles de expresión de precursores de miARN.* El ARN total se aisló a partir de las líneas celulares o tejidos en 1 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). El tejido congelado (~10 mg) se pulverizó primero en un mortero y mano de mortero de acero inoxidable. El ARN total a partir de páncreas normales se adquirió en Ambion (Austin, TX), BD Biosciences (Mountain View, CA) y Stratagene (La Jolla, CA). Todos los donantes del tejido normal fallecieron por complicaciones distintas de las enfermedades pancreáticas (Fig. 3). La integridad del ARN se evaluó usando el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). El índice de integridad del ARN (RIN) se determinó usando el algoritmo RIN del software Agilent 2100 expert, de acuerdo con el protocolo en Imbeaud, S., et al. (2005), Nucleic Acids Res 33, e56. Las masas de ARN con un $RIN \geq 4$ se incluyeron en el estudio (Fig. 3). El ARN se trató brevemente con ADNasa I sin RNasa y cADN se sintetizó a partir de 1 μ g de ARN total usando cebadores específicos de genes a 222 precursores de miARN más 18S rARN. Se formaron perfiles de la expresión de 222 precursores de miARN usando un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real. Se realizaron PCR por duplicado para cada gen precursor de miARN en cada muestra de cADN. La C_T media se determinó a partir de las PCR duplicadas. La expresión genética relativa se calculó como $2^{- (C_{TmiRNA} - C_{T18S rARN})}$. La expresión genética relativa se multiplicó por 10^6 para simplificar la presentación de los datos. Los datos de expresión de precursores de miARN relativos sin procesar se presentan en la Figura 4.

25 *Estadística.* Los Datos de ΔC_T para 201 valores de expresión genética (con respecto a la expresión genética de control) se centraron en la media y se analizaron usando la siguiente estrategia. Los patrones de expresión de datos infiltrados se evaluaron usando formación de grupos jerárquicos sin supervisar de muestras de genes basándose en la unión media de la distancia Euclidiana (Eisen MB, et al. (1998), Proc Natl Acad Sci USA 95: 14863-8; Saeed AI, et al. (2003), Biotechniques 34: 374-8). Para determinar los genes que se expresan de forma diferencial entre grupos de muestras, los datos se filtraron en la significación de las diferencias usando ensayo de ANOVA basado en permutaciones de grupos múltiples (aproximación de Welch) con $p < 0,01$ (10.000 permutaciones aleatorias) y corrección de ensayos múltiples (corrección hacia abajo de Westfall-Young con máxT). Para comparar los patrones de expresión de genes expresados de forma diferencial, los datos filtrados se analizaron usando formación de grupos jerárquicos de muestras y formación de grupos jerárquicos de genes basándose en la unión media y a la distancia Euclidiana.

El análisis de grupos adicionales de datos filtrados se realizó usando un mapa de terreno de expresión (Kim, et al. (2001), Science, 293: 2087-92). Los mapas de terreno proporcionan una visión tridimensional de los principales grupos inherentes en los datos. Primero se formaron mapas de las muestras en una rejilla bidimensional en la que la colocación de cada elemento está influenciada por un número de los vecinos más cercanos basándose en la distancia Euclidiana que se calculó usando datos de expresión de precursores de miARN. La tercera dimensión se determina mediante la densidad puntos sobre la rejilla bidimensional y su valor se proyecta como una superficie; los picos más altos indican números mayores de elementos muy similares. También se calculó la correlación media entre cada par de muestras. Cada par de muestras con una correlación media por encima del umbral (0,8) se indica en el mapa de terreno de expresión con una línea que conecta las dos muestras. Esto permite visualizar subconjuntos de muestras con un patrón muy correlacionado de expresión de miARN. Los picos que representan muestras a partir de un grupo en particular se marcan con esferas codificadas con colores en la parte superior de cada pico.

50 Un algoritmo de aprendizaje automático supervisado se aplicó para la clasificación de muestras basándose en los datos de expresión de miARN sin filtrar. Se calcularon las puntuaciones predictivas para cada miARN basándose en una comparación de clase 2 (normal frente a tumor) de datos de expresión usando el análisis de predicción de algoritmo de micromatrices (PAM) (Tibshirani R, et al. (2002), Proc Natl Acad Sci USA 99: 6567-72) basándose en procedimientos de entrenamiento, validación cruzada dejando un valor fuera y de ensayo. La división de las muestras en conjuntos de entrenamiento y ensayo se realiza usando el enfoque aceptado comúnmente de datos de división de forma aleatoria en conjuntos de entrenamiento y ensayo (normalmente 2/3 para el entrenamiento, 1/3 para el ensayo). Para este estudio, muestras tumorales se dividieron de forma aleatoria en ~75 % para el entrenamiento y un 25 % para el ensayo. Dado que el número de casos normales era pequeño ($N = 6$), los casos normales se incluyeron solamente en el conjunto de entrenamiento. El número pequeño de muestras de pancreatitis crónica ($N = 4$) no se incluyeron en el análisis de PAM. Mientras tanto, se realizaron dos niveles de control de calidad para eliminar tejido benigno adyacente que contuviera cualquier célula tumoral, el ARN se extrajo a partir de tejido entero en lugar de tejido microdisecionado. Por lo tanto, no pudimos descartar completamente la posibilidad de que alguna célula tumoral contaminara al tejido benigno adyacente, ni tampoco sabemos si han ocurrido cambios premalignos en estas muestras benignas que se obtienen a partir de tejido adyacente a tumor. Por lo tanto, las muestras benignas se excluyeron del conjunto de entrenamiento para entrenar al clasificador en casos verdaderos

normales y tumorales. Los casos benignos se usaron en el conjunto de ensayo.
RESULTADOS

Validación de genes de control interno: El tejido pancreático es rico en ribonucleasas y se debe tener cuidado durante el aislamiento del ARN para reducir la posibilidad de autólisis. Para validar la integridad del ARN aislado a partir de tejido pancreático, ~100 ng de cada muestra de ARN se sometió a ensayo usando el Bioanalizador Agilent 2100. Cincuenta y dos tejidos tenían un RIN ≥ 4 (media 7,6, intervalo 4,3-9,6, Fig. 3).

La expresión del precursor de miARN en cada una de las muestras se determinó usando PCR en tiempo real y se normalizó a un gen de control interno. Dado que se añadieron cantidades equivalentes de ARN total a cada reacción RT, 18S rARN se validó como el control interno por comparación de la expresión media entre las diversas muestras (es decir tumoral, normal y benigna). No había diferencia estadísticamente significativa en la expresión media de 18S rARN entre las muestras de tumor o el páncreas normal ($p = 0,116$, Fig. 5). La expresión del 18S rARN en el tejido tumoral y normal determinada aquí está de acuerdo con las que se han indicado anteriormente en tejido pancreático (Rubie C, et al., (2005) Mol Cell Probes 19: 101-9). Dado que no había diferencia significativa en la expresión del 18S rARN entre los grupos tumoral, normal y benigno, 18S rARN se seleccionó como el gen de control interno en el estudio.

Formación de perfiles de precursores de miARN en tejidos pancreáticos: La expresión de 201 precursores de miARN, que representan a los 222 miARN descubiertos a partir de abril de 2005 se perfiló en 28 tumores, 15 tejidos benignos adyacentes, cuatro muestras de ensayo de pancreatitis crónica, seis tejidos de páncreas normal y nueve líneas celulares de cáncer de páncreas. Se realizó formación de grupos jerárquicos sin supervisar de muestras en todo el conjunto de datos sin filtrar para las líneas celulares de tumor, páncreas normal, pancreatitis y cáncer de páncreas. El mapa de calor demuestra que los datos de expresión sin filtrar de solamente 201 precursores de miARN clasifica las muestras de forma suficiente en grupos de páncreas normal, tumoral, pancreatitis crónica y líneas celulares (Fig. 6).

La expresión de miARN de 15 tejidos benignos adyacentes a partir de los pacientes con cáncer de páncreas idéntico se incluyó junto con los páncreas normales, pancreatitis, tumores de páncreas y líneas celulares de cáncer. Los datos de expresión de precursores de miARN se filtraron usando ANOVA de grupos múltiples. El filtrar estadístico de datos se considera convenientemente que es una etapa necesaria del procesamiento previo de datos de porque los datos expresión genética. El agrupamiento jerárquico de muestras y genes se realizó en dos 112 miARN resultantes. El agrupamiento jerárquico de datos filtrados nos permitió identificar grupos principales de miARN que tienen diferentes patrones de expresión en los cuatro grupos de muestras resultantes (Fig. 7). Un grupo contenía solamente líneas celulares. Otro grupo contenía todos los 6 páncreas normales y 9 de 15 tejidos benignos. Un tercer grupo contenía las 4 muestras de ensayo de pancreatitis crónica y 1 de tejido benigno. Finalmente, un grupo grande contenía 28 de 28 tumores y 5 tejidos benignos (Fig. 7).

Los datos filtrados también se analizaron usando una técnica diferente de formación de grupos conocida como mapas de terreno de expresión. El mapa de terreno separó los datos de expresión en 5 grupos de muestras principales (Fig. 8). Del mismo modo que la formación de grupos jerárquicos, el mapa de terrenos para grupos de muestras a partir del páncreas normal, las líneas celulares, adenocarcinomas de páncreas y pancreatitis crónica. Este análisis mostró que cada uno de los grupos de muestras ocupa distintas regiones en el mapa de terreno de expresión proporcionando de este modo evidencias adicionales de que cada uno de los 4 grupos de muestras tiene distintos patrones de expresión de miARN y sugiere la posibilidad de encontrar subconjuntos de microARN que discriminen muestras normales y tumorales. La mayor parte del tejido benigno adyacente se agrupó entre el normal y tumoral, mientras que las muestras benignas que se agruparon con el tumor también se agruparon con el tumor en el mapa de terreno (Fig. 8). Como una característica adicional del mapa de terreno, las correlaciones promedio de todos los valores de expresión de miARN se calcularon entre cada par de muestras. Las correlaciones por encima del umbral de 0,8 se muestran como líneas que conectan pares de muestras con patrones similares de expresión de miARN. Esto permite visualizar subconjuntos de muestras con un patrón altamente correlacionado de expresión de miARN. Las muestras dentro de cada uno de los 4 grupos principales están conectadas (es decir, correlación promedio $> 0,8$) pero no lo estaban entre las conexiones de grupos, excepto para dos muestras de pancreatitis que se correlacionaron con algunas de las muestras de tumor (Fig. 8).

La comparación de perfil de expresión genética entre diferentes tejidos de páncreas sea usado para eliminar las contribuciones de estroma y proliferación celular (por ejemplo, línea celular) e identificar genes expresados en tumores de páncreas. Un intento para realizar dicho análisis en los datos de expresión de miARN en la Figura 7 no fue satisfactorio debido a la expresión uniformemente elevada en las líneas celulares de cáncer y la expresión uniformemente baja en las muestras de pancreatitis. Sin embargo, se identificó un número de posibles miARN relacionados tumores que estaban aumentados en las líneas celulares y/o tumores pero no en el normal o pancreatitis (Fig.7).

Análisis de datos mediante Análisis de Predicción de algoritmo de Micromatrices (PAM): El algoritmo de clasificación PAM se usó para determinar si los datos de expresión de miARN podían predecir con qué clase se ajustan las muestras (tumoral o normal) y para determinar los miARN expresados de forma diferencial, más importantes

relacionados con el adenocarcinoma de páncreas. Los datos sin filtrar en 201 pre-miARN se analizaron con el algoritmo PAM de acuerdo con el método que se describe en Tibshirani R, et al. (2002), Proc Natl Acad Sci USA 99, 6567-72. Los tres genes con más de un 75 % de datos que faltan se eliminaron del análisis para evitar posibles artefactos que el algoritmo de imputación. Se realizaron entrenamiento y validación cruzada con PAM usando los 6 páncreas normales y 18 tumores de páncreas. PAM ha clasificado correctamente un 100 % de las muestras normales y tumorales (Fig. 9A). El ensayo con PAM se realizó en 10 muestras de tumor y 15 muestras benignas adyacentes. PAM ha clasificado correctamente un 100 % de las muestras tumorales sometidas a ensayo y 11 de 15 de las muestras benignas sometidas a ensayo (Fig. 9B). Los 68 miARN mejor clasificados expresados diferencialmente en adenocarcinoma de páncreas tal como se seleccionan con PAM se enumeran en la Figura 10. Los 20 miARN mejor clasificados expresados diferencialmente en adenocarcinoma de páncreas tal como se seleccionan con PAM se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1 - 20 precursores principales de miARN expresados de forma anómala en adenocarcinoma de páncreas

Clasificación	Nombre	valor p (ensayo de t)	Tasa de cambio	Ubicación del cromosoma
1	miR-221	5,66E-05	26,2	Xp11.3
2	miR-424	3,62E-08	56,3	Xq26.2
3	miR-301	1,11E-05	34,2	17q23.2
4	miR-100	4,40E-06	36,9	11q24.1
5	miR-376a	7,00E-04	7,79	14q32.31
6	miR-125b-1	1,00E-04	23,2	11q24.1
7	miR-021	2,00E-04	15,7	17q23.2
8	miR-345	1,44E-15	-14,5	14q32.2
9	miR-016-1	3,73E-04	14,3	13q14.2
10	miR-181a,c	8,31E-04	18,6	9q33.3, 19p13.13
11	miR-092-1	3,40E-03	19,6	13q31.3
12	miR-015b	4,00E-04	8,55	3q25.33
13	miR-142-P	3,63E-07	-15,4	17q23.2
14	miR-155	1,51E-03	14,0	21q21
15	let-7f-1	4,00E-04	10,9	9q22.32
16	miR-212	2,00E-04	22,2	17p13.3
17	miR-107	3,86E-05	8,20	10q23.31
18	miR-024-1,2	9,12E-08	8,17	9q22.32, 19p13
19	let-7d	7,06E-04	8,38	9q22.32
20	miR-139	6,79E-11	-7,91	11q13.4

DISCUSIÓN

Aquí se presentan los resultados del primer estudio detallado de formación de perfiles de expresión de miARN en adenocarcinoma ductal pancreático. La formación de perfiles de expresión identificó un gran número de miARN que se expresan de forma anómala en el adenocarcinoma ductal pancreático.

Se cree que los miARN funcionan principalmente como reguladores negativos de la expresión genética que sigue a la unión consecuencias conservadas dentro de la región sin traducir en la posición 3' de los mRNA diana. Mientras

que las funciones biológicas del miARN están bajo intensa investigación, se cree que definen y mantienen el destino celular de una manera similar a los factores de transcripción mediante la regulación de la elección del momento oportuno y diferenciación del desarrollo. Dado que las alteraciones en las vías de desarrollo desempeñan un papel crítico en el desarrollo del cáncer de páncreas, alteraciones en la expresión de miARN pueden ser contribuyente importante en el desarrollo de adenocarcinoma de páncreas.

La formación de perfiles de expresión de miARN identificó correctamente 28 de 28 tejidos como tumorales (Fig. 9). Todos los 6 páncreas normales se pronosticaron correctamente y 11 de 15 tejidos vecinos adyacentes se clasificaron como tejido normal (Fig. 9). Los datos presentados aquí muestran que la formación de perfiles de expresión de miARN puede generar una firma molecular única para un cáncer dado.

Los tres factores que probablemente dirigen las diferencias en la expresión genética entre tejido tumoral y normal son los acinos normales, estroma y células tumorales. Nosotros confirmamos por PCR in situ en RT que 3 de los miARN principales expresados diferencialmente que se identificaron en la identificación sistemática se localizan en las células tumorales (Fig. 11). Algunos de los tejidos benignos no se pudieron agrupar con el páncreas normal (Fig. 7). A pesar de que se usaron 2 niveles de control de calidad para reducir la posibilidad de contaminación de células tumorales, es posible que algunas células tumorales estuvieran presentes en el tejido benigno ya que el ARN se aisló a partir de tejido entero y no tejido microdisecionado. Otra posibilidad es que ya se han producido cambios de premalignos en algunos de los tejidos benignos ya que esas muestras se obtienen a partir de tejido adyacente al tumor. Apoyando este concepto se encuentra el hecho de que la mayoría de las muestras benignas (y también pancreatitis crónica) se encuentran entre el páncreas normal tumoral en el mapa del terreno de expresión (Fig. 8). Esta observación muestra que la formación de perfiles de expresión de miARN puede detectar alteraciones premalignas que se han producido en estos tejidos benignos.

Algunos de los miARN expresados diferencialmente del cáncer de páncreas estaban expresados de forma anómala en otros cánceres. Estos incluyen miR-155, que estaba aumentado en el presente estudio en linfoma de linfocitos B grandes difusos; miR-21 estaba aumentado aquí y en glioblastomas, cáncer de mama y cáncer de tiroides papilar; miR-221 estaba aumentado en cáncer de páncreas, en glioblastoma y en cáncer de tiroides. miR-221 está localizado a ~700 bp de miR-222 en el cromosoma X; se predice que tanto miR-221 como miR-222 se unen a y regulan el kit. El precursor de miR-222 no estaba entre los 20 miARN y tales expresados diferencialmente, sin embargo, el análisis posterior de miR-222 maduro por PCR mostró que miR-222 estaba aumentado en el cáncer de páncreas a niveles que eran similares a los de miR-221 (no se muestran los datos). Por lo tanto, la desregulación de los miARN que se ha mencionado anteriormente puede ser única para el cáncer en general. Los miARN expresados diferencialmente en otros cánceres no estaban desregulados hasta el mismo grado que en el cáncer de páncreas. La familia let-7, disminuida en el cáncer de pulmón, aquí estaba aumentada. La expresión del policistrón miR-17-92 (que codifica a miR-17, -18, -19a, -19b-1 y -92-1) estaba aumentado en linfoma y en cáncer colorrectal pero no estará significativamente alterada en el cáncer de páncreas. Nosotros presentamos la desregulación de un número de miARN en cáncer de páncreas tal como miR-376a, miR-212, miR-301 y miR-181a que no se han presentado en ningún otro cáncer en nuestro conocimiento. También es de interés el hecho de que la mayoría de los miARN desregulados presentados aquí muestran expresión aumentada en los tumores en comparación con el páncreas normal. Unos pocos miARN presentaban expresión reducida en cáncer de páncreas, incluyendo miR-375 y miR-139 (Tabla 1, Figuras 12-13). miR-375 se clonó a partir del páncreas y se cree que es específico de células de islotes (Poy MN, et al. (2004) Nature, 432: 226-30).

EJEMPLO 2

Transferencia de Northern de expresión de miARN maduro en tejido de cáncer de páncreas

El ensayo de en tiempo real usado en el EJEMPLO 1 cuantifica los precursores de miARN y no al miARN maduro, activo. Se realizó transferencia de Northern en el ARN idéntico usado en el análisis de PCR en tiempo real para validar el miARN maduro se correlacionaba con el miARN precursor.

Los niveles de expresión de miR-100, miR-375 y miR-155 maduros a partir de tres páncreas normales y 4 pares de tejido tumoral/benigno adyacente igualaron los niveles de precursores de miARN por PCR (Fig. 12). miR-100 y miR-155 estaban entre los 20 miARN principales expresados diferencialmente (Tabla 1). miR-375 se validó mediante transferencia de Northern ya que fue uno de los pocos miARN con expresión disminuida en el cáncer de páncreas. A pesar de que miR-375 no estaba entre los 20 miARN principales (Tabla 1), la expresión de miR-375 tanto precursor como maduro estaba significativamente disminuida en el cáncer de páncreas mediante PCR en tiempo real ($p < 1 \times 10^{-5}$). La expresión de miARN en el tejido benigno y tumoral emparejados estaba en consecuencia aumentada o disminuida en todos los casos, demostrando que las diferencias en la expresión de miARN entre tumor y benigno se deben a diferencias en tejidos del paciente individual y no se deben a diferencias en la expresión media del grupo.

Transferencia de Northern. La transferencia de Northern se realizó tal como se ha descrito anteriormente en Lau NC, et al. (2001), Science 294: 858-62 y Schmittgen TD, et al. (2004), Nucleic Acids Res 32: E43. Oligonucleótidos de ADN del complemento inverso del miARN maduro se usaron como sondas. Las transferencias se separaron satisfactoriamente y se volvieron a investigar hasta tres veces.

EJEMPLO 3

PCR en tiempo real de miARN maduro en tejido de cáncer de páncreas

Los datos de PCR en tiempo real que se han descrito en el EJEMPLO 1 se validaron usando un ensayo de PCR en tiempo real disponible en el mercado para amplificar y cuantificar el miARN maduro. La expresión del miARN maduro se validó para los 28 miARN principales expresados de forma anómala a partir de PAM. cADN a partir de los siguientes tejidos se sometió a ensayo: 6 páncreas normales, 16 adenocarcinomas de páncreas y 10 tejidos adyacentes benignos que se pronosticaron como normales a partir de PAM.

La expresión de miARN maduro estaba muy correlacionada con el precursor de miARN (Figuras 13 y 14). Para nuestro conocimiento, ésta es la presentación inicial de la expresión de miARN tanto precursor como maduro determinada mediante ensayos sensibles de PCR en tiempo real. Es de interés que a pesar de que los valores de expresión relativa para estos miARN maduros abarcaba 3-logs (de 0,1 a 100), la tendencia en la expresión diferencial entre los tejidos tumoral y normal se mantuvo (Fig. 14). Esto sugiere que la función de los miARN en páncreas tumoral y normal a diferentes niveles de expresión, incluso la expresión diferencial se mantiene entre el tejido canceroso y normal.

PCR en tiempo real de miARN maduro. Se realizaron ensayos para cuantificar el miARN maduro (es decir, Ensayos de microARN con TaqMan®, Applied Biosystems Foster City, CA) tal como se describe en Chen, C., et al. (2005), Nucleic Acids Res 33: e179, con una modificación. Un cóctel de 5X que contiene 28 cebadores RT en bucle antisentido diferentes se preparó por concentración de las soluciones de reserva 2X en un Speed Vac. Cien nanogramos de ARN total se calentaron durante 5 minutos a 80 °C y a continuación se incubó durante 5 minutos a 60 °C con 10 µM del cebador antisentido 18S rARN seguido de enfriamiento a temperatura ambiente. A continuación se añadieron tres microlitros de la mezcla 5X de cebador en bucle y se preparó el cADN. Esto permitió la creación de una biblioteca de 28 cADN de miARN más el control interno de 18S rARN. Se realizó PCR en tiempo real (reacción total de 10 µl) tal como se ha descrito usando 1 µl de una dilución a 1:50 de cADN. Se realizaron PCR o duplicados para cada gen de miARN maduro en cada muestra de cADN. La C_T media se determinó a partir de las PCR por duplicado. La expresión genética se calculó con respecto a 18S rARN tal como se ha descrito anteriormente y se multiplicó por 10⁶ para simplificar la presentación de datos.

EJEMPLO 4

PCR in situ en RT de precursores de miARN en células de tumor pancreático

La expresión de miARN de tipo celular se estudió usando PCR in situ en RT. Se seleccionaron miR-221, miR-376a y miR-301 para la PCR in situ dado que estaban entre los miARN principales expresados diferencialmente (Tabla 1) y tenían expresión aumentada en el tumor y líneas celulares en comparación con el páncreas normal y pancreatitis (Fig. 7). Nosotros estábamos particularmente interesados en la expresión de tipo celular de miR-376a dado que estaba clonado a partir de células de páncreas en Poy M. N., et al. (2004), Nature 432, 226-30. De sus resultados mostraron que miR-221 y miR-376a estaban localizados en las células tumorales y no en los acinos pancreáticos benignos o en las células del estroma (Fig. 11) ni en los conductos benignos (no se muestran). miR-301 también estaba localizado en el tumor (no se muestran los datos).

PCR in situ en RT. El protocolo de PCR in situ en RT se realizó tal como se ha descrito anteriormente en Nuovo GJ, et al. (1999), Proc Natl Acad Sci USA 96, 12754-9. En resumen, el tiempo óptimo de digestión con proteasas se determinó usando incorporación no específica de nucleótido indicador digoxigenina dUTP. La digestión óptima con proteasas fue seguida de incubación durante una noche en DNasa sin RNasa (10 U por muestra, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) y RT/PCR en una etapa usando el sistema r⁷th y digoxigenina dUTP. El cromógeno es nitroazul de tetrazolio y fosfato de bromocloroindolilo (NBT/BCIP) usando rojo rápido nuclear como el colorante de contraste. Las secuencias de los cebadores para los precursores de miR-221, miR-301 y miR-376a fueron las mismas que las usadas para la formación de perfiles en el EJEMPLO 1. Los controles negativos incluyeron la omisión de los cebadores y la sustitución con cebadores y relevantes (específicos del virus del papiloma humano), ya que este virus no infecta el tejido pancreático. Se realizó PCR in situ en RT en la muestra embebida en parafina fijada con formalina, archivada 1050005A2(T) (Fig. 3).

EJEMPLO 5

Identificación de miARN específicos de páncreas y enriquecidos

Para identificar los miARN que son específicos al tejido pancreático normal o que están enriquecidos en tejido pancreático normal, se describió la expresión de 184 miARN maduros usando PCR en tiempo real en 22 tejidos humanos normales. Estos tejidos incluyen adiposo, vejiga, cerebro, cuello del útero, colon, esófago, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo esquelético, ovarios, páncreas, placenta, próstata, bazo, intestino delgado, tráquea, timo, tiroides, testículos y linfocitos B normales. Los miARN específicos del páncreas se definieron como los miARN con

alta expresión en el páncreas y expresión de escasa a indetectable en los otros 21 tejidos normales. Los miARN enriquecidos en páncreas se definieron como los miARN con expresión de 10 veces o superior en el tejido pancreático en comparación con la media de los otros 21 tejidos. Los miARN enriquecidos en páncreas pueden estar presentes en algunos de los otros tejidos. Los miARN específicos del páncreas incluyen miR-216 y miR-217. Los miARN enriquecidos en páncreas incluyen miR-7, miR-148a y miR-375.

Tabla 2. miARN específicos de páncreas y enriquecidos en páncreas

miARN específico de páncreas	Expresión, páncreas	Expresión media, tejidos restantes	Tasa de Cambio	Otros tejidos con expresión significativa
miR-216	3,60 E-07	0	ND	Ninguno
miR-217	6,64 E-08	6,67 E-10	99,5	Ninguno
miARN enriquecidos en páncreas				
miR-7	3,06 E-06	2,69 E-07	11,3	Cerebro, tiroides,
miR-148a	3,61 E-05	2,15 E-06	16,7	
miR-375	0,0001588	2,92 E-06	54,3	

EJEMPLO 6

10 Descripción de miARN maduro en tejidos de páncreas

Para identificar los miARN que se expresan diferencialmente en cáncer de páncreas, se formaron perfiles de expresión de 184 miARN maduros usando PCR en tiempo real en 9 tumores de cáncer de páncreas y en páncreas a partir de 6 donantes con enfermedad pancreática. Se formó perfil de miARN maduro usando un ensayo de PCR en tiempo real disponible en el mercado (Ensayos de microARN con TaqMan®, Applied Biosystems Foster City, CA). El ensayo se realizó tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los datos de PCR en tiempo real se presentaron como un mapa de calor y se analizaron usando formación de grupos jerárquicos sin supervisar (Figura 15). Algunos miARN presentarán expresión indetectable en todas las 15 muestras, estos miARN no se incluyeron en el mapa de calor. Un gran número de miARN maduro presenta la expresión aumentada en los tumores de páncreas en comparación con el páncreas normal. El mapa de calor también demuestra que el perfil de expresión de miARN maduro era capaz de distinguir los tumores de páncreas a partir del normal dado que ambos aparecen como ramas separadas del dendrograma. La tasa de cambio en la expresión del miARN maduro en el tumoral en comparación con el normal y el valor de p se muestran en la Figura 16.

25 EJEMPLO 7

La expresión de miR-21 aumenta en células cancerosas de páncreas

Se usaron varios enfoques para demostrar que la expresión de miR-21 maduro estaba localizada en células de adenocarcinoma de páncreas y no en acinos, estroma u otras células no cancerosas del páncreas. (Fig. 17) Se aplicó RT-PCR in situ a una sección de páncreas normal (A) y cáncer de páncreas (B) y se demostró que la expresión aumentada de miR-21 está localizada en el tumor. Se aislaron adenocarcinoma ductal pancreático y conductos pancreáticos normales (no cancerosos) a partir de varias muestras de ensayo usando microdissección con láser. Se aisló ARN a partir del tejido microdisseccionado y el miR-21 maduro así como el control interno de 18S rARN se cuantificó por PCR en tiempo real. El miR-21 maduro estaba básicamente incrementado en el tejido tumoral microdisseccionado en comparación con conductos de páncreas normal (C). El miR-21 maduro se sometió a ensayo en 9 muestras de ensayo de tumores de páncreas y en 6 muestras de ensayo de páncreas normal usando el ensayo de PCR en tiempo real disponible en el mercado para miARN maduro tal como se ha descrito anteriormente. La expresión de miR-21 maduro estaba aumentada en los tumores (D). La expresión de miR-21 maduro se cuantificó por PCR en tiempo real en dos líneas celulares epiteliales de páncreas normal y en 7 líneas celulares de cáncer de páncreas humano incluyendo tres que se derivaron de cáncer metastásico y cuatro que se derivaron de cáncer de páncreas primario. La expresión de miR-21 maduro estaba aumentada en todas las siete líneas celulares de cáncer de páncreas en comparación con las líneas celulares de páncreas normal (E).

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar si un sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, adenocarcinoma ductal pancreático, que comprende medir el nivel de un producto génico de miR que es una forma precursora o madura de MIR-021 (SEC ID N°: 32) en una muestra biológica procedente del páncreas del sujeto, en el que un aumento en el nivel del producto génico de miR en la muestra biológica en comparación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control de tejido pancreático normal es indicativo de que el sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, adenocarcinoma ductal pancreático.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende medir el nivel de una combinación de productos génicos de miR seleccionados entre formas precursoras o maduras del grupo de miR que se enumeran en la Fig. 16 en una muestra biológica procedente del páncreas del sujeto, en el que una disminución en el nivel de producto génico de miR en la muestra biológica en comparación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control de tejido pancreático normal es indicativa de que el sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, adenocarcinoma ductal pancreático en el caso de let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7 g, let-7i, miR-009*, miR-010a, miR-010b, miR-015a, miR-016, miR-017-3p, miR-017-5p, miR-018, miR-020, miR-022, miR-023a, miR-023b, miR-024, miR-026a, miR-027a, miR-027b, miR-028, miR-029b, miR-030e-3p, miR-031, miR-034a, miR-034b, miR-034c, miR-093, miR-098, miR-099a, miR-099b, miR-100, miR-101, miR-103, miR-106b, miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-126*, miR-127, miR-130a, miR-132, miR-135b, miR-140, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-143, miR-145, miR-146, miR-146b, miR-148b, miR-149, miR-150, miR-152, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-181c, miR-181d, miR-183, miR-186, miR-189, miR-190, miR-191, miR-192, miR-193, miR-194, miR-195, miR-196a, miR-199a*, miR-199b, miR-200a, miR-200b, miR-203, miR-210, miR-212, miR-213, miR-214, miR-218, miR-221, miR-222, miR-223, miR-296, miR-301, miR-324-3p, miR-324-5p, miR-330, miR-331, miR-338, miR-339, miR-340, miR-342, miR-345, miR-346, miR-361, miR-370, miR-372, miR-374, miR-376a, miR-378, miR-379, miR-382, miR-422b, miR-423 y miR-425, y en el que la combinación incluye una forma precursora o madura de MIR-021.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende medir los niveles de una combinación de productos génicos de miR seleccionados entre formas precursoras o maduras del grupo de secuencias de miR que consisten en MIR-021 (SEC ID N°: 32), MIR-221 (SEC ID N°: 172), MIR-301 (SEC ID N°: 178), MIR-212 (SEC ID N°: 161), MIR-100 (SEC ID N°: 69), let-7i SEC ID N°: 11), MIR-222-P (SEC ID N°: 173), MIR-155 (SEC ID N°: 124), MIR-023a (SEC ID N°: 34), MIR-181a (SEC ID N°: 125), MIR-376 (SEC ID N°: 210), let-7a-2-P (SEC ID N°: 2), let-7b (SEC ID N°: 4), let-7c (SEC ID N°: 5), let-7d (SEC ID N°: 6), let-7f-1 (SEC ID N°: 8), MIR-001-2 (SEC ID N°: 13), MIR-007-1 (SEC ID N°: 14), MIR-015a (SEC ID N°: 22), MIR-015b (SEC ID N°: 23), MIR-016-1 (SEC ID N°: 24), MIR-019b-1-P (SEC ID N°: 29), MIR-024-1,2 (SEC ID N°: 36, 37), MIR-027a, b (SEC ID N°: 42, 43), MIR-029a,c (SEC ID N°: 45, 46), MIR-030d (SEC ID N°: 53), MIR-032 (SEC ID N°: 56), MIR-092-1 (SEC ID N°: 61), MIR-098 (SEC ID N°: 66), MIR-099a (SEC ID N°: 67), MIR-107 (SEC ID N°: 78), MIR-125b-1 (SEC ID N°: 85), MIR-126 (SEC ID N°: 87), MIR-128a (SEC ID N°: 89), MIR-132 (SEC ID N°: 94), MIR-136 (SEC ID N°: 102), MIR-145-P (SEC ID N°: 112), MIR-152 (SEC ID N°: 120), MIR-181c (SEC ID N°: 126), MIR-196a-2 (SEC ID N°: 144), MIR-213 (SEC ID N°: 162), MIR-215 (SEC ID N°: 164), MIR-218-1,2 (SEC ID N°: 167, 168), MIR-328 (SEC ID N°: 189), MIR-331-P (SEC ID N°: 191), MIR-345 (SEC ID N°: 198), MIR-367 (SEC ID N°: 201) y MIR-424 (SEC ID N°: 221), en el que un aumento en el nivel del producto génico de miR en la muestra biológica en comparación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control de tejido pancreático normal es indicativo de que el sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, adenocarcinoma de páncreas, y en el que la combinación incluye una forma precursora o madura de MIR-021.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el grupo de secuencias de miR consiste en let-7b, let-7c, let-7d, let-7f-1, let-7i, MIR-007-1, MIR-015a, MIR-015b, MIR-016-1, MIR-021, MIR-023a, MIR-024-1,2, MIR-027a,b, MIR-030d, MIR-098, MIR-099a, MIR-100, MIR-125b-1, MIR-126, MIR-132, MIR-142-P, MIR-145-P, MIR-152, MIR-155, MIR-181a,c, MIR-196a-2, MIR-212, MIR-213, MIR-218-1,2, MIR-221, MIR-222-P, MIR-301, MIR-331-P, MIR-345 y MIR-376, y en el que la combinación incluye una forma precursora o madura de MIR-021.
5. El método de la reivindicación 3, en el que el grupo de secuencias de miR consiste en let-7b; let-7d; let-7f-1; let-7i, MIR-015a; MIR-015b; MIR-016-1; MIR-021; MIR-023a, MIR-024, MIR-100; MIR-125b; MIR-132, MIR-155, MIR-181a, MIR-181c; MIR-196a-2, MIR-212; MIR-221; MIR-301 y MIR-376a, y en el que la combinación incluye una forma precursora o madura de MIR-021.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos un producto génico de miR adicional en una muestra biológica procedente del páncreas del sujeto, en el que un aumento en el nivel del producto génico de miR en la muestra biológica en comparación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control de tejido pancreático normal es indicativo de que el sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, adenocarcinoma ductal pancreático; y en el que el al menos un producto génico de miR

adicional se selecciona entre el grupo que consiste en: let-7a-2-P, let-7b, let-7c, let-7d, let-7f-1, let-7i, MIR-015b, MIR-019b-1-P, MIR-098, MIR-128a, MIR-135b, MIR-136, MIR-152, MIR-155, MIR-181a, MIR-196a-2, MIR-212, MIR-215, MIR-218-1, MIR-218-2, MIR-301, MIR-328, MIR-331-P, MIR-424 o cualquier combinación de los mismos.

5 7. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos un producto génico de miR adicional en una muestra biológica procedente del páncreas del sujeto, en el que un aumento en el nivel del producto génico de miR en la muestra biológica en comparación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control de tejido pancreático normal es indicativo de que el sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, adenocarcinoma ductal pancreático; y en el que el al menos un producto génico de miR
10 adicional es MIR-155.

8. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos un producto génico de miR adicional en una muestra biológica procedente del páncreas del sujeto, en el que una disminución en el nivel de producto génico de miR en la muestra biológica en comparación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control de tejido pancreático normal es indicativa de que el sujeto padece, o está en riesgo de desarrollar, adenocarcinoma ductal pancreático; y en el que el al menos un producto génico de miR adicional se selecciona entre el grupo que consiste en: MIR-139 (SEC ID N°: 106), MIR-337 (SEC ID N°: 193), MIR-133b (SEC ID N°: 97), MIR-096-P (SEC ID N°: 65), MIR-371 (SEC ID N°: 205), MIR-383 (SEC ID N°: 217), MIR-092-2-P (SEC ID N°: 62), MIR-204 (SEC ID N°: 155), MIR-299-P (SEC ID N°: 177), MIR-375 (SEC ID N°: 209), MIR-188b-P (SEC ID N°: 135), y MIR-129-2 (SEC ID N°: 91) o cualquier combinación de los mismos.
15
20

9. El método de la reivindicación 8, en el que el al menos un producto génico de miR adicional es MIR-096-P.

10. El método de la reivindicación 8, en el que el al menos un producto génico de miR adicional es MIR-375.
25

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que al menos un producto génico de miR cuyo nivel se mide es miARN maduro.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la muestra biológica comprende tejido pancreático, tumor pancreático, células pancreáticas o jugo pancreático.
30

FIG. 1

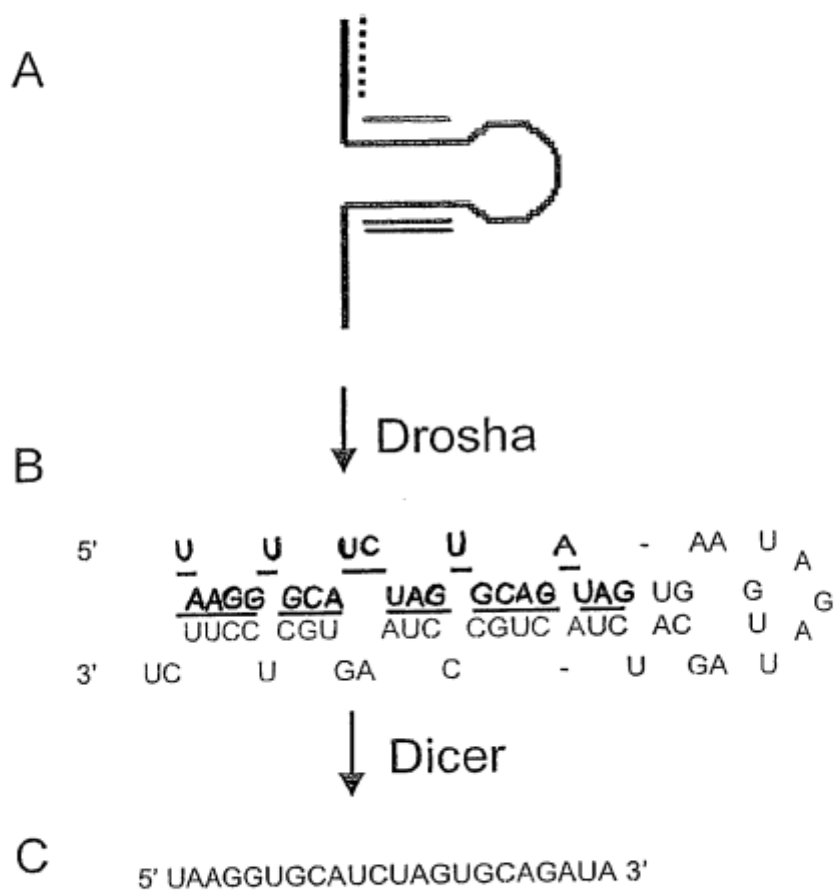


FIG. 2

SECUENCIAS DE PRODUCTO GENÉTICO DE MIR HUMANO

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID nº
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-let-7a-1-prec	TGGGATGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTATAGGGTCACACCCACCACTGGGAGATA ACTATACAATCTACTGTCTTTCCTA	1
hsa-let-7a-2-prec	AGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTATAGAATTACATCAAGGGAGATAACTGTAC AGCCTCCTAGCTTTCCT	2
hsa-let-7a-3-prec	GGGTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTGGGGCTCTGCCCTGCTATGGGATAACTAT ACAATCTACTGTCTTTCCT	3
hsa-let-7b-prec	CGGGGTGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTTCAGGGCAGTGATGTTGCCCTCGGAAG ATAACTATACAACCTACTGCCTTCCCTG	4
hsa-let-7c-prec	GCATCCGGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTATAGATTACACCTGGGAGTTAA CTGTACAACCTTCTAGCTTTCCTTGGAGC	5
hsa-let-7d-prec	CCTAGGAAGAGGTAGTAGGTTGCATAGTTTATAGGGCAGGGATTTGCCACAAGG AGGTAAGTATACGACCTGCTGCCTTTCCTAGG	6
hsa-let-7e-prec	CCCGGGCTGAGGTAGGAGGTTGTATAGTTGAGGAGGACACCCAAGGAGATCACT ATACGGCCTCCTAGCTTTCCTCAGG	7
hsa-let-7f-1-prec	TCAGAGTGAGGTAGTAGATTGTATAGTTGTGGGGTAGTGATTTTACCCTGTTTCAGG AGATAACTATACAATCTATTGCCTTCCCTGA	8
hsa-let-7f-2-prec	TGTGGGATGAGGTAGTAGATTGTATAGTTTATAGGGTCATACCCCATCTTGGAGATA ACTATACAGTCTACTGTCTTTCCTCAGC	9
hsa-let-7g-prec	AGGCTGAGGTAGTAGTTTGTACAGTTTGGAGGTCATGATACCAACCCGGTACAGG AGATAACTGTACAGGCCACTGCCTTGCCA	10
hsa-let-7i-prec	CTGGCTGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTTGGTCGGGTTGTGACATTGCCCGCTGTGGA GATAACTGCGCAAGCTACTGCCTTGCTA	11
hsa-mir-001-1-prec	TGGGAAACATACTTCTTTATATGCCCATATGGACCTGCTAAGCTATGGAATGTAAA GAAGTAIGTATCTCA	12
hsa-mir-001-2-prec	ACCTACTCAGAGTACATACTTCTTTATGTACCCATATGAACATACAATGCTATGGA ATGTAAAGAAGTATGTAATTTTGGTAGGC	13
hsa-mir-007-1-prec	TTGGATGTTGGCCTAGTTCTGTGTGGAAGACTAGTGATTTTGTGTTTTAGATAA CTAAATCGACAACAAATCACAGTCTGCCATATGGCACAGGCCATGCCTCTACAG	14
hsa-mir-007-2-prec	CTGGATACAGAGTGGACCGGCTGGCCCCATCTGGAAGACTAGTGATTTTGTGTT GTCTTACTGCGCTCAACAACAAATCCAGTCTACCTAATGGTGCCAGCCATCGCA	15

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID nº
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-007-3-prec	AGATTAGAGTGGCTGTGGTCTAGTGCTGTG <u>TGGAAGACTAGTGATTTTGTGTTCT</u> GATGTACTACGACAACAAGTCACAGCCGGCCTCATAGCGCAGACTCCCTTCGAC	16
hsa-mir-009-1-prec	CGGGGTTGGTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAAGTGGTGTGGAGTCTTCAI <u>AAAGCTAGATAACCGAAAGTAAAAATAACCCCA</u>	17
hsa-mir-009-2-prec	GGAAGCGAGTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAAGTGTATTGGTCTTCAAA <u>AGCTAGATAACCGAAAGTAAAAACTCCTTCA</u>	18
hsa-mir-009-3-prec	GGAGGCCCGTTTCTCTCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAAGTGCCACAGAGCCGTCAI <u>AAAGCTAGATAACCGAAAGTAGAAATGATTCTCA</u>	19
hsa-mir-010a-prec	GATCTGTCTGTCTTCTGTATATACCTGTAGATCCGAATTTGTGTAAGGAATTTTGT GGTCACAAATTCGTATCTAGGGGAATATGTAGTTGACATAAACACTCCGCTCT	20
hsa-mir-010b-prec	CCAGAGGTTGTAACGTTGTCTATATATACCTGTAGAACCGAATTTGTGTGGTATC CGTATAGTCACAGATTTCGATTCTAGGGGAATATATGGTCGATGCAAAAACCTCA	21
hsa-mir-015a-prec	CCTTGGAGTAAAGTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGATTTGAAAAGGTGCAGGC CATATTGTGCTGCCTCAAAAATACAAGG	22
hsa-mir-015b-prec	TTGAGGCCTTAAAGTACTGTAGCAGCACATCATGGTTTACATGCTACAGTCAAGA TGCGAATCATTATTTGCTGCTCTAGAAATTTAAGGAAATTCAT	23
hsa-mir-016-1-prec	GTCAGCAGTGCCTTAGCAGCACGTAAATATTGGCGTTAAGATTCTAAAATTATCTC CAGTATTAACGTGTGCTGCTGAAGTAAGGTTGAC	24
hsa-mir-016-2-prec	GTTCCACTCTAGCAGCACGTAAATATTGGCGTAGTGAAATATATATTAACACCA ATATTACTGTGCTGCTTAGTGAGC	25
hsa-mir-017-prec	GTCAGAATAATGTCAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGTGATATGTGCATCTACTGC <u>AGTGAAGGCACCTTGTAGCATTATGGTGAC</u>	26
hsa-mir-018a-prec	TGTTCTAAGGTGCATCTAGTGCAGATAGTGAAGTAGATTAGCATCTACTGCCCTAA <u>GTGCTCCTTCTGGCA</u>	27
hsa-mir-019a-prec	GCAGTCCTCTGTTAGTTTTCATAGTTGCACTACAAGAAGAATGTAGTIGTGCAAA <u>CTATGCAAAACTGA</u> TGGTGGCCTGC	28
hsa-mir-019b-1-prec	CACTGTTCTATGGTTAGTTTTCAGGTTTGCATCCAGCTGTGTGATATTCTGCTGTG <u>CAAAATCCATGCAAAACTGACTGTGGTAGTG</u>	29
hsa-mir-019b-2-prec	ACATTGCTACTTACAATTAGTTTTCAGGTTTGCATTTACAGCTATATATGTATAT GTGGCTIGTGCAAAATCCATGCAAAACTGATTGTGATAATGT	30
hsa-mir-020a-prec	GTAGCACTAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAGTGTTTAGTTATCTACTGCATTATGAG CACTAAAGTACTGC	31

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID Nº
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-021-prec	TGTCGGGTAGCTTATCAGACTGATGTTGACTGTTGAATCTCATGGCAACACCAAGTC GATGGGCTGTCTGACA	32
hsa-mir-022-prec	GGCTGAGCCGCACTAGTCTTCTCAGTGGCAAGCTTTATGTCCTGACCCAGCTAAAG CTGCCAGTTGAAGAAGCTTGCCTCTGCC	33
hsa-mir-023a-prec	GGCCGGCTGGGGTTCTGGGGATGGGATTGCTTCCTGTCACAAATCACATTGCCA GGGATTTCCAACCGACC	34
hsa-mir-023b-prec	CTCAGGTGCTCTGGCTGCTTGGGTTCTTGGCATGCTGATTGTGACTTAAGATTAA AATCACATTGCCAGGGATTACCAAGCAACCAAGACCTTGGC	35
hsa-mir-024-1-prec	CTCCGGTGCTACTGAGCTGATATCAGTTCTCATTTTACACACTGGCTCAGTTCAAG CAGGAACAGGAG	36
hsa-mir-024-2-prec	CTCTGCCTCCCGTGCCTACTGAGCTGAAACACAGTTGGTTTGTGTACACTGGCTCA GTTCAAGCAGGAACAGGG	37
hsa-mir-025-prec	GGCCAGTGTGAGAGGCGGAGACTTGGGCAATTGCTGGACGCTGCCCTGGGCATT GCACCTTGCTCTGGTCTGACAGTGCCGGCC	38
hsa-mir-026a-1-prec	GTGGCCTCGTTCAAGTAATCCAGGATAGGCTGTGCAGGTCCCAATGGGCCTATTCT TGGTTACTTGACACGGGGACGC	39
hsa-mir-026a-2-prec	GGCTGTGGCTGGATTCAAGTAATCCAGGATAGGCTGTTCCATCTGTGAGGCCTAT TCTTGATTACTTGTCTTGGAGGCACT	40
hsa-mir-026b-prec	CCGGGACCCAGTTCAAGTAATCCAGGATAGGTTGTGTGCTGTCCAGCCTGTTCTCC ATTACTTGGCTCGGGGACCGG	41
hsa-mir-027a-prec	CTGAGGAGCAGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCAGGGTCCACACCAAGTCGTGTTACAC AGTGGCTAAGTTCCGCCCCCAAG	42
hsa-mir-027b-prec	ACCTCTTAACAAGGTGCAGAGCTTAGCTGATTGGTGAACAGTGATTGGTTTCCGC TTTGTTACAGTGGCTAAGTTCTGCACCTGAAGAGAAGGTG	43
hsa-mir-028-prec	GGTCCTTGCCCTCAAGGAGCTCACAGTCTATTGAGTTACCTTTCTGACTTTCCAC TAGATTGTGAGCTCCTGGAGGGCAGGCACT	44
hsa-mir-029a-prec	ATGACTGATTTCTTTTGGTGTTGAGTCAATATAATTTCTAGCACCATCTGAAA TCGGTAT	45
hsa-mir-029c-prec	ATCTCTTACACAGGCTGACCGATTTCTCTGGTGTTGAGTCTGTTTTGTCTAGC ACCATTTGAAATCGGTTATGATGTAGGGGA	46
hsa-mir-029b-1-prec	CTTCAGGAAGCTGGTTTCATATGGTGGTTAGATTAAATAGTGATTGTCTAGCAC CATTTGAAATCAGTGTCTTGGGGG	47

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID nº
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-029b-2-prec	CTTCTGGAAGCTGGTTTCACATGGTGGCTTAGATTTTCCATCTTTGTATCT <u>AGCAC</u> <u>CATTGAAATCAGTGT</u> TTAGGAG	48
hsa-mir-030a-prec	GCGACTGTAAACATCCTCGACTGGAAGCTGTGAAGCCACAGATGGGCTTTCAGTC <u>GGATGTTGCAGCTGC</u>	49
hsa-mir-030b-prec	ACCAAGTTTCAGTTCATGTAAACATCCTACACTCAGCTGTAATACATGGATTGGCT GGGAGGTGGATGTTTACTTCAGCTGACTTGA	50
hsa-mir-030c-1-prec	ACCATGCTGTAGTGTGTGTAAACATCCTACACTCTCAGCTGTGAGCTCAAGGTGGC TGGGAGAGGGTTGTTTACTCCTTCTGCCATGGA	51
hsa-mir-030c-2-prec	AGATACTGTAAACATCCTACACTCTCAGCTGTGGAAAGTAAAGAAAGCTGGGAGAA GGCTGTTTACTCTTCT	52
hsa-mir-030d-prec	GTTGTGTAAACATCCCCGACTGGAAGCTGTAAAGACACAGCTAAGCTTTCAGTCA GATGTTTGCTGCTAC	53
hsa-mir-030e-prec	GGCAGTCTTTGCTACTGTAAACATCCTTGACTGGAAGCTGTAAAGGTGTTTCAGAG GAGCTTTCAGTCGGATGTTTACAGCGGCAGGCTGCCA	54
hsa-mir-031-prec	GGAGAGGAGGCAAGATGCTGGCATAGCTGTTGAAGTGGGAACCTGCTATGCCAAC ATATTGCCATCTTCC	55
hsa-mir-032-prec	GGAGATATTGCACATTACTAAGTTGCATGTTGTACCGCCTCAATGCAATTTAGTG TGTGTATATTTTC	56
hsa-mir-033-prec	CTGTGGTGCAATTGTAGTTGCATTGCATGTTCTGGTGGTACCCATGCAATGTTTCCA CAGTGCAACACAG	57
hsa-mir-034a-prec	GGCCAGCTGTGAGTGTCTTTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTGTGAGCAATAGT AAGGAAGCAATCAGCAAGTATACTGCCCTAGAAGTGCTGCACGTTGTGGGGCCC	58
hsa-mir-034b-prec	GTGCTCGGTTTGTAGGCAGTGTCTTAGCTGATTGTACTGTGGTGGTTACAATCAC TAACTCCACTGCCATCAAAACAAGGCAC	59
hsa-mir-034c-prec	AGTCTAGTTACTAGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGCTAATAGTACCAATCACTAACC ACACGGCCAGGTAAAAAGATT	60
hsa-mir-092-1-prec	CTTCTACACAGGTTGGGATCGGTTGCAATGCTGTGTTTCTGTATGGTATTGCACT <u>IGTCCCGGCCIGTTGAGTTGG</u>	61
hsa-mir-092-2-prec	TCATCCCTGGGTGGGGATTGTTGCATTACTTGTGTTCTATATAAAGTATTGCACTT <u>GTCCCGCCCTGTGGAAGA</u>	62
hsa-mir-093-prec	CTGGGGCTCCAAAGTGCTGTTCGTGCAGGTAGTGTGATTACCAACCTACTGCTG AGCTAGCACTTCCCGAGCCCCGG	63

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID n°
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-095-prec	AACACAGTGGGCACTCAATAAAATGCTGTGAATTGAAATGCGTTACATTCAACG GGTATTATTGAGCACCCACTCTGTG	64
hsa-mir-096-prec	TGGCCGATTTTGGCACTAGCACATTTTGGCTGTGTCTCTCCGCTCTGAGCAATCAT GTGCAGTGCCAATATGGGAAA	65
hsa-mir-098-prec	AGGATTCTGCTCATGCCAGGGTGAGGTAGTAAGTTGTATTGTGTGGGGTAGGGA TATTAGGCCCAATTAGAAGATAACTATACAACCTACTACTTCCCTGGTGTGTGG CATAITCA	66
hsa-mir-099a-prec	CCCATGGCATAAACCCGTAGATCCGATCTTGTGGTGAAGTGACCGCACAAAGCT CGCTTCTATGGGTCTGTGTCTAGTGTG	67
hsa-mir-099b-prec	GGCACCCACCCGTAGAACCGACCTTGGCGGGGCTTCGCGGCACACAAGCTCGTGT CTGTGGGTCCGTGTC	68
hsa-mir-100-prec	CCTGTTGCCACA AACCCGTAGATCCGAACCTTGTGGTATTAGTCCGCACAAGCTTGT ATCTATAGGTATGTGTCTGTTAGG	69
hsa-mir-101-1-prec	TGCCCTGGCTCAGTTATCACAGTGCTGATGCTGTCTATTCTAAAGGTACAGTACTG IGATAACTGAAGGATGGCA	70
hsa-mir-101-2-prec	ACTGTCCTTTTCGGTTATCATGGTACCGATGCTGTATATCTGAAAGGTACAGTAC TGTGATAACTGAAGAATGGTGGT	71
hsa-mir-103-1-prec	TACTGCCCTCGGCTTCTTTACAGTGCTGCCTTGTTCATATGGATCAAGCAGCATT GTACAGGGCTATGAAGGCATTG	72
hsa-mir-103-2-prec	TTGTGCTTTCAGCTTCTTTACAGTGCTGCCTTGTAGCATTCAAGTCAAGCAGCATT GTACAGGGCTATGAAGAACCA	73
hsa-mir-105-1-prec	TGTGCATCGTGGTCAAAATGCTCAGACTCCTGTGGTGGCTGCTCATGCACCACGGAT GTTTGAGCATGTGCTACGGTGTCTA	74
hsa-mir-105-2-prec	TGTGCATCGTGGTCAAAATGCTCAGACTCCTGTGGTGGCTGCTTATGCACCACGGAT GTTTGAGCATGTGCTACGGTGTCTA	75
hsa-mir-106a-prec	CCTTGGCCATGTA AAAAGTGCTTACAGTGACAGGTAGCTTTTGTAGATCTACTGCAAT GTAAGCACTTCTTACATTACCATGG	76
hsa-mir-106b-prec	CCTGCCGGGGCTAAAGTGCTGACAGTGACAGATAGTGGTCTCTCCGTGCTACCGC ACTGTGGGTACTTGTGCTCCAGCAGG	77
hsa-mir-107-prec	CTCTCTGCTTTCAGCTTCTTTACAGTGTTGCCTTGTGGCATGGAGTTCAAGCAGCA TGTACAGGGCTATCAAAGCACAGA	78
hsa-mir-108-prec	ACACTGCAAGAACAAATAAGGATTTTATAGGGGCATTATGACTGAGTCAGAAAACAC AGCTGCCCCTGAAAGTCCCTCATTTTCTTGTGTGCC	79

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID n°
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-122a-prec	CCTTAGCAGAGCTG <u>TGGAGTGTGACAATGGTGT</u> TTGTCTAAACTATCAAACGC CATTATCACACTAAATAGCTACTGCTAGGC	80
hsa-mir-124a-1-prec	AGGCCTCTCTCCGTGTTACAGCGGACCTTGATTTAAATGTCCATACAAT <u>TTAAG</u> <u>GCACGCGTGAAATGCCA</u> AGAATGGGGCTG	81
hsa-mir-124a-2-prec	ATCAAGATTAGAGGCTCTGCTCTCCGTGTTACAGCGGACCTTGATTTAATGTCA TACAAT <u>TTAAGGCACGCGTGAAATGCCA</u> AGAAGCGGAGCCTACGGCTGCACTTGAA	82
hsa-mir-124a-3-prec	TGAGGGCCCCCTCTGCGTGTTCACAGCGGACCTTGATTTAATGTCTATACAAT <u>TTAAG</u> <u>GCACGCGTGAAATGCCA</u> AGAAGGGCGCTCC	83
hsa-mir-125a-prec	TGCCAGTCTCTAGGTCCTGAGACCTTTAACCCTGTGAGGACATCCAGGGTCACA GGTGAAGTCTTGGGAGCCTGGCGTCTGGCC	84
hsa-mir-125b-1-prec	TGCGCTCCTCTCAGTCCCTGAGACCCTAACTTGTGATGTTTACCGTTAAATCCAC GGTTAGGCTCTTGGGAGCTGCGAGTCTGTCT	85
hsa-mir-125b-2-prec	ACCAGACTTTCTAGTCCCTGAGACCCTAACTTGTGAGGTATTTAGTAACATCA CAAGTCAGGCTCTTGGGACCTAGCGGAGGGGA	86
hsa-mir-126-prec	CGCTGGCGACGGGACATTATTACTTTTGGTACGCGCTGTGACACTTCAAAC <u>TCGTA</u> <u>CCGTGAGTAATAATGCCCGCTCCACGGCA</u>	87
hsa-mir-127-prec	TGTGATCACTGTCTCCAGCCTGCTGAAGCTCAGAGGGCTCTGATTAGAAAGATC ATCGGATCCGCTCTGAGCTTGGCTGGTCCGAAGTCTCATCATC	88
hsa-mir-128a-prec	TGAGCTGTGGATTCCGGGGCCGTAGCACTGTCTGAGAGGTTTACATTTCTCAGAGT <u>GAACCGGTCTCTTTT</u> TCAGCTGCTTC	89
hsa-mir-128b-prec	TGTGCAGTGGGAAGGGGGCCGATACACTGTACGAGAGTGAGTAGCAGGTCTCA <u>CAGTGAACCGGTCTCTTT</u> CCCTACTGTGTC	90
hsa-mir-129-2-prec	TGCCCTTCGCGAATCTTTTGGCGTCTGGGCTTGCTGTACATAACTCAATAGCCGG AAGCCCTTACCCCAAAAAGCATTTGCGGAGGGCG	91
hsa-mir-130a-prec	TGCTGCTGGCCAGAGCTCTTTTCACATTGTGCTACTGTCTGCACCTGTCACTAGCA <u>GTGCAATGTTAAAAGGGCAIT</u> GGCCGTGTAGTG	92
hsa-mir-130b-prec	GGCCTGCCCGACACTCTTTCCCTGTGCACTACTATAGGCCGCTGGGAAGCAGTGCC <u>AATGATGAAAGGGCAIT</u> CGGTACGGTC	93
hsa-mir-132-prec	CCGCCCCCGCGTCTCCAGGGCAACCGTGGCTTTCGATTGTTACTGTGGGAACCTGGA GGTAAACAGTCTACAGCCATGGTCCCGCCGACGACGCCACGCGC	94
hsa-mir-133a-1-prec	ACAATGCTTTGCTAGAGCTGGTAAATGGAACCAAAATCGCCTCTTCAATGGATT <u>GGTCCCTTCAACCAGCTGT</u> AGCTATGCATTGA	95

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID n°
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-133a-2-prec	GGGAGCCAAATGCTTTGCTAGAGCTGGTAAATGGAACCAAATCGACTGTCCAAT GGATTGGTCCCTTCAACCAGCTGAGCTGTGCATTGATGGCGCCG	96
hsa-mir-133b-prec	CCTCAGAAGAAAGATGCCCCCTGCTCTGGCTGGTCAAACGGAACCAAGTCCGTCT TCCTGAGAGGTGGTCCCTTCAACCAGCTACAGCAGGGCTGGCAATGCCAGT CCTTGGAGA	97
hsa-mir-134-prec	CAGGGTGTGTGACTGGTTGACCAGAGGGGCATGCACTGTGTTACCCCTGTGGGCC ACCTAGTCACCAACCCCTC	98
hsa-mir-135a-1-prec	AGGCCTCGCTGTCTCTATGGCTTTTATTCCTATGTGATTCTACTGCTCACTCATA TAGGGATTGGAGCCGTGGCGCACGCGGGGACA	99
hsa-mir-135a-2-prec	AGATAAATCACTCTAGTGCTTTATGGCTTTTATTCCTATGTGATAGTAATAAAG TCTCATGTAGGGATGGAAGCCATGAAATACATTGTGAAAAATCA	100
hsa-mir-135b-prec	CACTCTGCTGTGGCCATGGCTTTTATTCCTATGTGATTGCTGTCCCAAACCTCATG TAGGGCTAAAAGCCATGGGCTACAGTGAGGGGCGAGCTCC	101
hsa-mir-136-prec	TGAGCCCTCGGAGGACTCCATTTGTTTGTGATGGATTCTTATGCTCCATCATCG TCTCAAATGAGTCTTCAGAGGGTTCT	102
hsa-mir-137-prec	GGTCTCTGACTCTCTTCGGTGACGGGTATTCTTGGGTGGATAATACGGATTACGT TGTTATGGCTTAAGAATACGCGTAGTCGAGGAGAGTACCAGCGGCA	103
hsa-mir-138-1-prec	CCCTGGCATGGTGTGGTGGGGCAGCTGGTGTGTGAATCAGGCCGTTGCCAATCA GAGAACGGCTACTTCACAAACACAGGGCCACACCACACTACAGG	104
hsa-mir-138-2-prec	CGTTGCTGCAGCTGGTGTGTGAATCAGGCCGACGAGCAGCGCATCCTTTACCC GGCTATTTACGACACACAGGGTTGCATCA	105
hsa-mir-139-prec	GTGTATTCTACAGTGACGTTCTCCAGTGTGGCTCGGAGGCTGGAGACGCGGCC CTGTTGGAGTAAC	106
hsa-mir-140-prec	TGTGTCTCTCTGTGTCTCTGCCAGTGGTTTTACCCTATGGTAGGTTACGTCATGCT GTTCTACCACAGGGTAGAACCACGGACAGGATACCGGGGCACC	107
hsa-mir-141-prec	CGGCCGGCCCTGGGTCCATCTTCCAGTACAGTGTGGATGGTCTAATTGTGAAGCT CCTAACACTGTCIGGTAAAGATGGCTCCCGGGTGGGTTT	108
hsa-mir-142-prec	GACAGTGCAAGTACCCATAAAGTAGAAAGCACTACTAACAGCACTGGAGGGTGT AGTGTTTCCTACTTTATGGATGAGTGTACTGTG	109
hsa-mir-143-prec	GCGCAGCGCCCTGTCTCCAGCCTGAGGTGCAGTGTGCATCTCTGGTCAGTTGGG AGTCIGAGATGAAGCACTGTAGCTCAGGAAGAGAGAAGTTGTTCTGCAGC	110
hsa-mir-144-prec	TGGGGCCCTGGCTGGGATATCATATATACTGTAAGTTTGGATGAGACACTACA GTATAGATGATGTACTAGTCCGGGCAACCCCTC	111

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID nº
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-145-prec	CACCTTGCTCCTCACGGTCCAGT <u>TTTCCCAAGGAATCCCTTAGATGCTAAGATGGGGA</u> TTCTTGAAATACTGTTCTTGAGGTCATGGTT	112
hsa-mir-146a-prec	CCGATGTGTATCCTCAGCTT <u>TGAGAAGTGAATTCATGGGTTGTGTCAGTGTGAGA</u> CCTCTGAAATTCAGTCTTCAGCTGGGATATCTCTGTCATCGT	113
hsa-mir-147-prec	AATCTAAAGACAACATTTCTGCACACACACCAGACTATGGAAGCCAGTGTGTGGGA <u>AATGCTTCTGCTAGATT</u>	114
hsa-mir-148a-prec	GAGGCAAAGTTCTGAGACACTCCGACTCTGAGTATGATAGAAAGT <u>CAGTGCACTAC</u> <u>AGAAGTTGCTC</u>	115
hsa-mir-148b-prec	CAAGCACGATTAGCATTTGAGGTGAAGTTCTGTTATACACTCAGGCTGTGGCTCTC TGAAAGT <u>CAGTGCACTACAGAAGTTGCTCGAAAGCTTTCTA</u>	116
hsa-mir-149-prec	GCCGGCGCCCGAGCTCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCCGTGCTTGTCCGAGGAGGGA GGGAGGGACGGGGGCTGTGCTGGGGCAGCTGGA	117
hsa-mir-150-prec	CTCCCATGGCCCTGTCTCCCAACCTTGTACCAGTGCTGGGCTCAGACCCTGGTA CAGGCCTGGGGACAGGGACCTGGGGAC	118
hsa-mir-151-prec	TTTCTGCCCTCGAGGAGCTCACAGTCTAGTATGTCTCATCCCTACTAGACTGAA <u>GCTCCTTGAGGACAGGGATGGTCATACTCACCTC</u>	119
hsa-mir-152-prec	TGTCCCCCGGCCAGGTTCTGTGATACACTCCGACTCGGGCTCTGGAGCAGTCA <u>GTGCATGACAGAAGTTGGGCCCGGAAGGACC</u>	120
hsa-mir-153-1-prec	CTCACAGCTGCCAGTGTCAATTTTGTGATCTGCAGCTAGTATTCTCACTCCAGTTG <u>CATAGTCACAAAAGTGATCATTTGGCAGGTGTGGC</u>	121
hsa-mir-153-2-prec	AGCGGTGCCAGTGTCAATTTTGTGATGTTGCAGCTAGTAATATGAGCCCAGTTGC <u>ATAGTCACAAAAGTGATCATTTGGAAGCTGTG</u>	122
hsa-mir-154-prec	GTGGTACTTGAAGATAGGTTATCCGTGTGCTTTCGCTTTATTTGTGACGAATCAT <u>ACACGGTTGACCTATTTTCAGTACCAA</u>	123
hsa-mir-155-prec	CTGTAAATGCTAATCGTGATAGGGGTTTTCCTCCAAGTACTCCTACATATTAG CATTAAACAG	124
hsa-mir-181a-prec	AGAAGGGCTATCAGGCCAGCCTTCAGAGGACTCCAAGGAACATTCAACGCTGTGCG <u>GTGAGTTTGGGATTGAAAAAACCAGTACCGTTGACTGTACCTTGGGGTCCTTA</u>	125
hsa-mir-181c-prec	CGGAAAAATTGCCAAGGGTTTGGGGGAACATTCAACCTGTCCGGTGAGTTTGGGCA GCTCAGGCAAAACATCGACCGTTGAGTGGACCCCTGAGGCCTGGAAATTGCCATCCT	126
hsa-mir-181b-1-prec	CCTGTGCAGAGATTATTTTAAAGGTCACAATCAACATTCAATGCTGTCCGGTGG <u>GTGAACTGTGTGGACAAGCTCACTGAACAATGAATGCAACTGTGGCCCCGCTT</u>	127

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID Nº
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-181b-2-prec	CTGATGGCTGCACTCAACATTCATTGCTGTCGGTGGGTTTGAAGTCTGAATCAACTC ACTGATCAATGAATGCAAACTGCGGACCAAAACA	128
hsa-mir-182-prec	GAGCTGCTTGCCCTCCCCCGTTTGGCAATGGTAGAACTCACACTGGTGAGGTAA CAGGATCCGGTGGTTCAGACTTGCCAACCTATGGGGCGAGGACTCAGCCGGCAC	129
hsa-mir-183-prec	CCGAGAGTGTGACTCCTGTTCTGTGTATGGCACTGGTAGAATTCAGTGTGAACAG TCTCAGTCAGTGAATTACCGAAGGGCCATAAACAGAGCAGAGACAGATCCACGA	130
hsa-mir-184-prec	CCAGTCACGTCCCCTTATCACTTTTCCAGCCAGCTTTGTGACTGTAAGTGTGGGA CGGAGAACTGATAAGGGTAGGTGATTGA	131
hsa-mir-185-prec	AGGGGGCGAGGGATTGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGATGGTCCCTCCCCAGGGG CTGGCTTTCCTCTGGTCCTTCCCTCCA	132
hsa-mir-186-prec	TGCTTGTAACCTTCCAAAGAATTCTCCTTTGGGGCTTCTGGTTTATTTTAAGCCC AAAGGTGAATTTTGGGAAGTTTGAGCT	133
hsa-mir-187-prec	GGTCGGGCTCACCATGACACAGTGTGAGACCTCGGGCTACAACACAGGACCCGGG CGCTGCTCTGACCCCTCGTGTCTTGTTGTCAGCCGAGGGACGCAGGTCCGCA	134
hsa-mir-188-prec	TGCTCCCTCTCTCACATCCCTTGTCATGGTGGAGGGTGAGCTTCTGAAAACCCCTC CCACATGCAGGGTTTGCAGGATGGCGAGCC	135
hsa-mir-190-prec	TGCAGGCCTCTGTGTGATATGTTTGATATATTAGGTGTGTTATTTAATCCAATATAT ATCAAACATATTCTACAGTGTCTTGCC	136
hsa-mir-191-prec	CGGCTGGACAGCGGGCAACGGAATCCCAAAAGCAGCTGTTGTCTCCAGAGCAATC CAGCTGCGCTTGGATTTCGTCCCTGCTCTCTGCCT	137
hsa-mir-192-prec	GCCGAGACCGAGTGACAGGGCTCTGACCTATGAATTGACAGCCAGTGCTCTCGT CTCCCTCTGGCTGCCAATTCATAGGTACAGGTATGTTCCGCTCAATGCCAGC	138
hsa-mir-193a-prec	CGAGGATGGGAGCTGAGGGCTGGGTCTTTGCGGGCGAGATGAGGGTGTGGATC AACTGGCCTACAAAGTCCCACTTCTCGGCCCCCG	139
hsa-mir-194-1-prec	ATGGTGTTATCAAGTGTAACAGCAACTCCATGTGGACTGTGTACCAATTCCAGTG GAGATGCTGTACTTTTGATGGTTACAA	140
hsa-mir-194-2-prec	TGGTCCCGCCCCCTGTAAACAGCAACTCCATGTGGAAAGTCCCACTGTTCCAGTG GGCTGCTGTTATCTGGGGCGAGGGCCAG	141
hsa-mir-195-prec	AGCTTCCCTGGCTCTAGCAGCACAGAAATATTGGCACAGGGAAGCGAGTCTGCCA ATATTGGCTGTGCTGCTCCAGGCAGGGTGGTG	142
hsa-mir-196a-1-prec	GTGAATTAGGTAGTTTCATGTTGTTGGGCCCTGGGTTTCTGAACACAACAACATTAA ACCACCCGATTAC	143

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID nº
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-196a-2-prec	TGCTCGCTCAGCTGATCTGTGGCT <u>TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGGATTGAGTTTT</u> GAACTCGGCAACAAGAACTGCCTGAGTTACATCAGTCGGTTTTCTGTCGAGGGC	144
hsa-mir-196b-prec	ACTGGTCGGTGATT <u>TAGGTAGTTTCCTGTTGTTGGGATCCACCTTCTCTCGACAG</u> CACGACACTGCCTTCATTACTTCAGTTG	145
hsa-mir-197-prec	GGCTGTGCCGGGTAGAGAGGGCAGTGGGAGGTAAGAGCTCTTCACCC <u>TTACCCAC</u> <u>CTTCTCCACCCAGCATGGCC</u>	146
hsa-mir-198-prec	TCATTGGTCCAGAGGGGAGATAGGTTCTGTGATTTTCTCTTCTCTATAGAAT AAATGA	147
hsa-mir-199a-1-prec	GCCAACCCAGTGTT <u>CAGACTACCTGTT</u> CAGGAGGCTCTCAATGTGT <u>TACAGTAGTCT</u> <u>GCACATTGGTTAGGC</u>	148
hsa-mir-199a-2-prec	AGGAAGCTTCTGGAGATCCTGCTCCGTCGCC <u>CCAGTGTT</u> CAGACTACCTGTT <u>CAGG</u> ACAATGCCGTTG <u>TACAGTAGTCTGCACATTGGTT</u> AGACTGGGCAAGGGAGAGCA	149
hsa-mir-199b-prec	CCAGAGGACACCTCCACTCCGTCTA <u>CCAGTGTT</u> AGACTATCTGTT <u>CAGGACTCC</u> CAAATTGTACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGCTGGGCTGGGTTAGACCCTCGG	150
hsa-mir-200a-prec	CCGGGCCCTGTGAGCATCTTACCGGACAGTGCTGGATTCCAGCTTGACTCT <u>AA</u> <u>CACTGTCTGGTAACGATGTTCAAAGGTGACCCGC</u>	151
hsa-mir-200b-prec	CCAGCTCGGGCAGCCGTGGCCATCTTACTGGGCAGCATTGGATGGAGTCAGGTCT CTAATACTGCCTGGTAATGATGACGGCGGAGCCCTGCACG	152
hsa-mir-200c-prec	CCCTCGTCTTACCCAGCAGTGTTTGGGTGCGGTGGGAGTCTCTAATACTGCCGGG <u>TAATGATGGAGG</u>	153
hsa-mir-203-prec	GTGTTGGGACTCGCGCCTGGGTCCAGTGTTCTTAACAGTTCAACAGTTCTGTA GCGCAATTGTGAAATGTTT <u>AGGACCACTAG</u> ACCCGGCGGGCGCGCGACAGCGA	154
hsa-mir-204-prec	GGCTACAGTCTTCTTCATGTGACTCGTGGACT <u>TCCCTTGTGCATCCTATGCCTGAG</u> AATATATGAAGGAGGCTGGGAAGGCAAGGGACGTTCAATTGTCATCACTGGC	155
hsa-mir-205-prec	AAAGATCCTCAGACAATCCATGTGCTTCTCTTGT <u>TCTTCATTCCACCGAGTCTGT</u> CTCATACCAACCAGATTTCAGTGGAGTGAAGTTCAGGAGGCATGGAGCTGACA	156
hsa-mir-206-prec	TGCTTCCGAGGCCACATGCTTCTTATATCCCATATGGATTACTTTGCTAT <u>GGGA</u> <u>ATGTAAGGAAGTGTGTGGTTTCGGCAAGTG</u>	157
hsa-mir-208-prec	TGACGGGCGAGCTTTTGGCCCGGTTATACCTGATGCTCACGTATAAGACGAGCA <u>AAAAGCTTGTGGTCA</u>	158
hsa-mir-210-prec	ACCCGGCAGTGCTCCAGGCGCAGGGCAGCCCTGCCACCGCACACTGCGCTGC CCCAGACCACTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA <u>TCTGTGCCTGGGCAGCGCGACCC</u>	159

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID N°
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-211-prec	TCACCTGGCCATGTGACTTGTGGGC <u>TTCCCTTTGTCACTCCTTCGCC</u> TAGGGCTCTG AGCAGGGCAGGGACAGCAAAGGGGTGCTCAGTTGTCACTTCCACAGCACGGAG	160
hsa-mir-212-prec	CGGGGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCTTACTGC CCGGGCCGCCCTCAGT <u>AACAGTCTCCAGTCACGGCC</u> ACCGACGCTGGCCCCGCC	161
hsa-mir-213-prec	TGAGTTTGTAGGTTGCTTCACTGAACATTCAACGCTGTCGGTGAGTTTGAATTAA AATCAAA <u>ACCATCGACCGTTGATGTG</u> ACCCTATGGCTAACCATCATCTACTCCA	162
hsa-mir-214-prec	GGCCTGGCTGGACAGAGTTGTCTGTGTCTGCTGTCTACACTGTGTGCAGAAC ATCCGCTCACCTGT <u>ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT</u> CACATGACAACCCAGCCT	163
hsa-mir-215-prec	ATCATTGAGAAATGGTATACAGGAAAATGACCTATGAATTGACAGACAATATAGC TGAGTTGTCTGTCACTTCTTTAGGCCAATATTCTGTATGACTGTGCTACTTCAA	164
hsa-mir-216-prec	GATGGCTGTGAGTTGGCTTAACTCTCAGCTGGCAACTGTGAGATGTTACATAATCC CTCACAGTGGTCTCTGGGATTATGCTAAACAGAGCAATTTCTAGCCCTCACGA	165
hsa-mir-217-prec	AGTATAATTATTACATAGTTTTTGATGTGCGAGAT <u>ACTGCATCAGGA</u> ACTGATTGG <u>ATAAGAA</u> TCAGTCACCATCAGTTCTTAATGCATTGCCTTCAGCATCTAAACAAG	166
hsa-mir-218-1-prec	GTGATAATGTAGCGAGATTTTCTGTTGTGCTTGATCTAACCATGTGGTTGCGAGGT ATGAGTAAACATGGTTCGGTCAAGCACCATGGAACGTCACGCAGCTTCTACA	167
hsa-mir-218-2-prec	GACCACTCGCTGCGGGGCTTTCCTTTGTGCTTGATCTAACCATGTGGTGGAAACGAT GGAAACGGAACATGGTTCTGTCAAGCACCGCGGAAAGCACCGTGCTCTCTGCA	168
hsa-mir-219-1-prec	CCGCCCCGGGCGCGGCTCCTGATTGTCCAAACGCAATTCTCGAGTCTATGGCTCC GGCCGAGAGTTGAGTCTGGACGTCCCAGCCGCCGCCCCCAACCTCGAGCGGG	169
hsa-mir-219-2-prec	ACTCAGGGGCTTCGCCACTGATTGTCCAAACGCAATTCTGTACGAGTCTGCGGCC AACCGAGAATTGTGGCTGGACATCTGTGGCTGAGCTCCGGG	170
hsa-mir-220-prec	GACAGTGTGGCATTGTAGGGCTCCACACCGTATCTGACACTTTGGGCAGGGCAC CATGCTGAAGGTGTTTCATGATGCGGTCTGGGAACCTCTACGGATCTTACTGATG	171
hsa-mir-221-prec	TGAACATCCAGGTCTGGGGCATGAACCTGGCATAACAATGTAGATTCTGTGTTCGT TAGGCAACAGCTACATTGCTGCTGGGTTTCAGGCTACCTGGAAACATGTTCTC	172
hsa-mir-222-prec	GCTGCTGGAAGGTGTAGGTACCCTCAATGGCTCAGTAGCCAGTGTAGATCCTGTC TTTCGTAATCAGCAGCTACATCTGGCTACTGGGTCTCTGATGGCATCTTCTAGCT	173
hsa-mir-223-prec	CCTGGCCTCCTGCAGTGCCACGCTCCGTGATTTGACAAGCTGAGTTGGACACTCC ATGTGGTAGAGTGTCACTTTGTCAAAATACCCCAAGTGCGGCACATGCTTACCAG	174
hsa-mir-224-prec	GGGCTTTCAGGTCAGTGTGGTTCCGTTTAGTAGATGATTGTGCATTGTTCAAAA TGGTGCCCTAGTGACTACAAAGCCC	175

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID nº
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-296-prec	AGGACCCTTCCAGAGGGCCCCCTCAATCCTGTGTGCCTAATTCAGAGGGTTGG GTGGAGGCTCTCCTGAAGGGCTCT	176
hsa-mir-299-prec	AAGAAATGGTTTACCGTCCACATACATTTGAATATGTATGTGGGATGGTAAAC CGCTTCTT	177
hsa-mir-301-prec	ACTGCTAACGAATGCTCTGACTTTATGCACTACTGTACTTTACAGCTAGCAGTGC AATAGTATTGTCAAAGCATCTGAAAGCAGG	178
hsa-mir-302a-prec	CCACCACTTAAACGTGGATGTACTTGCTTTGAACTAAAGAAGTAAGTGCTTCCAT GTTTGGTGATGG	179
hsa-mir-302b-prec	GCTCCCTTCAACTTTAACAATGGAAGTGCTTTCTGTGACTTTAAAAGTAAGTGCTTC CATGTTTAGTAGGAGT	180
hsa-mir-302c-prec	CCTTGTCTTTAACATGGGGGTACCTGCTGTGTGAAACAAAAGTAAGTGCTTCCATG TTTCAGTGGAGG	181
hsa-mir-302d-prec	CCTCTACTTTAACAATGGAGGCACTTGTGTGACATGACAAAAATAAGTGCTTCCAT GTTTGAGTGIGG	182
hsa-mir-320-prec	GCTTCGCTCCCTCCGCTTCTCTTCCCGTTCTTCCCGAGTCGGGAAAAGCTGG GTTGAGAGGGCGAAAAGGATGAGGT	183
hsa-mir-321-prec	TTGGCTCTTAAGCCAGGGATTGTGGGTTTCGAGTCCCCACCGGGGTAAAGAAAGG CCGA	184
hsa-mir-323-prec	TTGGTACTTGGAGAGAGGTGGTCCGTGGCGCTTCGCTTTATTTATGGCGCACATT ACACGGTCGACCTCTTGCAGTATCTAATC	185
hsa-mir-324-prec	CTGACTATGCCTCCCGCATCCCCTAGGGCATTTGGTGTAAAGCTGGAGACCCACT GCCCCAGGTGCTGCTGGGGGTTGTAGTC	186
hsa-mir-325-prec	ATACAGTGCTTGGTTCTTAGTAGGTGTCAGTAAGTGTGTGTGACATAATTGTTT ATTGAGGACCTCCTATCAATCAAGCACTGTGCTAGGCTCTGG	187
hsa-mir-326-prec	CTCATCTGTCTGTGGGCTGGAGGCAGGGCCTTTGTGAAGGCGGGTGGTGTCTCAG ATCGCTCTGGGCCCTTCCCTCAGCCCCGAGGCGGATTCA	188
hsa-mir-328-prec	TGGAGTGGGGGGCAGGAGGGGCTCAGGGAGAAAGTGCATACAGCCCCTGCCCC TCTTGGCCCTTCCGTCCCTG	189
hsa-mir-330-prec	CTTTGGCGATCACTGCCTCTCTGGGCTGTGTCTTAGGCTCTGCAAGATCAACCGA GCAAAAGCACACGGCCTGCAGAGAGGCAGCGCTCTGCCC	190
hsa-mir-331-prec	GAGTTTGGTTTTGTTTGGGTTTGTCTAGGTATGGTCCAGGGATCCCAGATCAAA CCAGGCCCTGGGCCATCTCTAGAACCAACCTAAGCTC	191

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID n°
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-335-prec	TGTTTGAAGCGGGGGTCAAGAGCAATAACGAAAAATGTTTGCATAAACCGTTTT TCATTATTGCTCCTGACCTCCTCTCATTGCTATATTCA	192
hsa-mir-337-prec	GTAAGTCAGTAGTTGGGGGGTGGGAACGGCTTCATACAGGAGTTGATGCACAGTTA TCCAGCTCCATATGATGCGCTTCTTCATCCCCCTCAA	193
hsa-mir-338-prec	TCTCCAACAATATCCTGGTGCTGAGTGATGACTCAGGCGACTCCAGCATCAGTGA TTTTGTTGAAGA	194
hsa-mir-339-prec	CGGGGCGGCGCTCTCCCTGTCCTCCAGGAGCTCACGTGTGCTGCCTGTGAGCGC CTCGACGACAGAGCCGGCGCCTGCCCCAGTGTCTGCGC	195
hsa-mir-340-prec	TTGTACCTGGTGTGATTATAAAGCAATGAGACTGATTGTCATATGTCGTTTGTGGG ATCCGCTCAGTTACTTTATAGCCATACCTGGTATCTTA	196
hsa-mir-342-prec	GAAACTGGGCTCAAGGTGAGGGGTGCTATCTGTGATTGAGGGACATGGTTAATGG AATTGCTCACACAGAAATCGCACCCGTCACCTTGGCCTACTTA	197
hsa-mir-345-prec	ACCCAAACCCTAGGTCTGCTGACTCCTAGTCCAGGGCTCGTGATGGCTGGTGGGC CCTGAACGAGGGGTCTGGAGGCCTGGGTTTGAATATCGACAGC	198
hsa-mir-346-prec	GTCTGTCTGCCCCGATGCCCTGCCTCTCTGTTGCTCTGAAGGAGGCAGGGGCTGGGC CTGCAGCTGCCTGGGCAGAGCGGCTCCTGC	199
hsa-mir-361-prec	GGAGCTTATCAGAAATCTCCAGGGGTACTTTATAATTTCAAAAAGTCCCCCAGGTGT GATTCTGATTTGCTTC	200
hsa-mir-367-prec	CCATTACTGTTGCTAATATGCAACTCTGTTGAATATAAATTGGAATTGCACTTTAG CAATGGTGATGG	201
hsa-mir-368-prec	AAAAGGTGGATATTCCTTCTATGTTTATGTTATTTATGGTTAAACATAGAGGAAAT TCCACGTTTT	202
hsa-mir-369-prec	TTGAAGGGAGATCGACCGTGTATATTCGCTTTATTGACTTCGAATAATACATGGT TGATCTTTCTCAG	203
hsa-mir-370-prec	AGACAGAGAAGCCAGGTCACGTCTCTGCAGTTACACAGCTCACGAGTGCCCTGCTG GGGTGGAACCTGGTCTGTCT	204
hsa-mir-371-prec	GTGGCACTCAAACGTGGGGGCACTTTCTGCTCTCTGGTGAAAGTGCCGCCATCTT TTGAGTGTTAC	205
hsa-mir-372-prec	GTGGGCCTCAAAATGTGGAGCACTATTCTGATGTCCAAGTGGAAAGTGCTGCGACA TTTGAGCGTCAC	206
hsa-mir-373-prec	GGGATACTCAAAATGGGGGCGCTTTCCTTTTGTCTGTACTGGGAAGTGCTTCGAT TTTGGGGTGTCCT	207

FIG. 2

Nombre	Secuencia Precursora (5' a 3')	SEC ID Nº
	Una secuencia subrayada dentro de una secuencia precursora representa un miARN maduro	
hsa-mir-374-prec	TACATCGGCCA <u>TTATAATACAACCTGATAAGT</u> GTATAGCACTTATCAGATTGTAT TGTAATTGTCTGTGTA	208
hsa-mir-375-prec	CCCCGCGACGAGCCCCTCGCACAAACCGGACCTGAGCGT <u>TTTGTTCTGTTCTGGCTCG</u> <u>CGTGAGGC</u>	209
hsa-mir-376a-1-prec	TAAAAGGTAGATTCTCCTTCTATGAGTACATTATTTATGATTAATCATAGAGGAAA <u>ATCCACGTTTT</u> C	210
hsa-mir-377-prec	TTGAGCAGAGGTTGCCCTTGGTGAATTCGCTTTATTTATGTTGAATCACAACAAAGG <u>CAACTTTTGTTT</u> G	211
hsa-mir-378-prec	AGGGCTCCTGACTCCAGGTCCTGTGTGTACCTAGAAATAGCACTGGACTTGGAG TCAGAAGGCCT	212
hsa-mir-379-prec	AGAGATGGTAGACTATGGAACTAGGCGTTATGATTCTGACCTATGTAACATGG TCCACTAACTCT	213
hsa-mir-380-prec	AAGATGGTTGACCATAGAACATGCGCTATCTCTGTGTCGTATGTAATATGGTCCAC <u>ATCTT</u>	214
hsa-mir-381-prec	TACTTAAAGCGAGGTTGCCCTTTGTATATTCGGTTTATTGACATGGAAATATACAAG <u>GGCAAGCTCTCTGTGAGTA</u>	215
hsa-mir-382-prec	TACTTGAAGAGAAGTTGTTCGTGGTGGATTCCGCTTFACTTATGACGAATCATTAC GGACAACACTTTTTTCAGTA	216
hsa-mir-383-prec	CTCTCAGATCAGAAGGTGATTGTGGCTTTGGGTGGATTAATCAGCCACAGCA CTGCCTGGTCAGAAAGAG	217
hsa-mir-384-prec	TGTTAAATCAGGAATTTAAACAATTCCTAGACAATATGTATAATGTTTCATAAGTC <u>ATTCTAGAAATTGTTCATAATGCCTGTAACA</u>	218
hsa-mir-422b-prec	CAGGGCTCCTGACTCCAGGTCCTGTGTGTTACCTAGAAATAGCACTGGACTTGGA <u>GTCAGAAGGCCTG</u>	219
hsa-mir-423-prec	ATAAAGGAAGTTAGGCTGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTTCTATTTTCCAAAAGC <u>TCGGTCTGAGGCCCTCAGTCTTGCTTCCTAACCCGCGC</u>	220
hsa-mir-424-prec	CGAGGGGATACAGCAGCAATTCATGTTTTGAAGTGTTCTAAATGGTTCAAAACGT GAGGCGCTGCTATACCCCTCGTGGGGAAGGTAGAAGGTGGGG	221
hsa-mir-425-prec	GAAAGCGCTTTGGAATGACACGATCACTCCCGTTGAGTGGCACCCGAGAAAGCCA <u>TCGGGAATGTCGTGTCGCGCCAGTGCTCTTC</u>	222

FIG. 3

Datos Clínicos y Patología Tumoral					
Tejidos de Páncreas Normal					
Nº de Muestra	Proveedor	Edad (años)/Género	Causa de la Muerte	RIN ^a	
N1	Ambion	82 / Femenino	Enfisema	9,6	
N2	Ambion	20 / Masculino	Traumatismo Craneal	7,8	
N3	Ambion	71 / Masculino	Accidente Vascular Cerebral	9,2	
N4	Ambion	71 / Masculino	Falta de Desarrollo	9,1	
BD	Clontech	35 / Masculino	Muerte súbita	7,5	
ST	Stratagene	72 / Masculino	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	6,8	
Tejidos de Adenocarcinoma Pancreático					
Nº de Muestra	Patología Tumoral	Diferenciación	Edad (años)/Género	RIN (tumoral)	RIN (benigno)
OUP2	T3NxMx	Moderadamente	85 / Masculino	8,2	7,0
OUP14	T3N0Mx invasiva	Escasa-moderada	71 / Masculino	7,8	3,8
OUP16	T3N1bMx	Buena	50 / Masculino	5,6	5,6
OUP20	T3N1aMx	Mal	70 / Masculino	8,2	3,4
OUP27	T3N0Mx invasiva	Moderada	86 / Masculino	3,3	5,8
OUP29	T3N0Mx invasiva	Escasa	63/ Masculino	8,3	7,0
OUP28	T3N1bMx invasiva	Escasa	48 / Femenino	7,9	6,9
OUP31	T3N0Mx	Escasa	38 / Masculino	7,7	7,0
OUP33	T3N1Mx	Escasa-moderada	42 / Femenino	5,1	8,3
OUP36	T3N1bMx	Moderada	56 / Femenino	7,7	7,8b
OUP37	T3N1bMx invasiva	Mod-escasa	79 / Masculino	7,1	Ningún Tejido
OUP42	T3N0Mx invasiva	Moderada	78 / Femenino	6,6	7,6
OUP48	T3N1bMx invasiva	Moderada	61/ Masculino	8,1	4,3
OUP49	T3N1aMx invasiva	Escasa-moderada	62 / Femenino	7,6	8,6
OUP91	T3N1bMx	Moderada	65 / Masculino	5,9	6,1
OUP97	T3N1bMx	Moderada	56 / Masculino	8,0	2,6
OUP101	T2N0Mx invasiva	Moderada	52 / Femenino	8,5	6,6
OUP105	T2N1aMx	Moderada	55 / Masculino	8,3	8,9
OUP122	T3N1aMx	Moderada	64 / Masculino	9,1	8,4
OUP123	T3N1bMx	Moderada-buena	52 / Masculino	6,4	7,6*
OUP135	T3N0Mx	Moderada	82 / Masculino	7,8	8,2b
OUP139	T2N0Mx	Moderada	50 / Masculino	6,6	6,7
0206C077B(T)	T3N0Mx	Moderadamente	49 / Masculino	7,2	Ningún Tejido
0206C138B(T)	T3N0M1	Intermedia	44 / Femenino	6,1	Ningún Tejido

FIG. 3

		hasta un alto grado			
1050005A2(T)	T3N1Mx	Escasamente	73 / Femenino	7,0	7,3
3030800A3(T)	T3N1Mx	Moderadamente	46 / Masculino	7,5	Ningún Tejido
3030396A1(T)	Tumor mucinoso Papilar intraductal	-	59 / Masculino	7,3	Ningún Tejido
3030401A1(T)	Tumor mucinoso Papilar intraductal	-	72 / Masculino	8,9	Ningún Tejido

FIG. 4

Cebadores de PCR usados para amplificar los precursores de miARN humanos, p. cebadores para la secuencia precursora primaria de miARN. Todos los demás cebadores hibridan con horquillas presentes tanto en el precursor primario (pri-miARN) como en el precursor pre-miARN (pre-miARN).

Gen	Amplifica secuencia de ratón	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')	Cebadores T _m (Directo/ Inverso) °C
U6	Si	CTCGCTTCGGCAGCACACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT	59/59
miR-001-1	Si	AAACATACTTCTTTATATGCCCA	TACATACTTCTTTACATTCCATAGC	52/51
miR-001-2	Si	ACATACTTCTTTATGTACCCATATG	TACATACTTCTTTACATTCCATAGC	50/51
miR-007-1	Si	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGT	AGACTGTGATTTGTTGTCGATT	52/53
miR-007-2	Si	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGT	AGACTGGGATTTGTTGTTGAG	52/53
miR-007-3	Si	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGT	GGCTGTGACTTGTGTCGTA	52/53
miR-009-1(p)	No	GGAGGCTGCGTGGGAAGAG	CGTGAGGCCGGCTTTC	58/57
miR-009-2(p)	No	CTGGAGTCTGGCAAGAGGA	AGTCTTTCATTCTCACACGCTC	55/55
miR-009-3(p)	No	CAGCGGCACCTGGCTAAG	GCTCGCACGCAGAAGTT	55/55
miR-010a,b	Si	TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG	ATTCCCTAGATACGAATTTGTGA	57/57
miR-015a	Si	CAGCACATAATGGTTTGTGGA	GCAGCACAAATATGGCCTG	56/55
miR-015b	Si	AGCACATCATGTTTACATGC	CTAGAGCAGCAAATAATGATTG	55/55
miR-016-1	Si	GCAGCACGTAAATATTGGCGT	CAGCAGCACAGTTAATACTGGAGA	59/57
miR-016-2	Si	GCACGTAAATATTGGCGTAGT	AAGCAGCACAGTAATATTGGTG	54/54
miR-017(p)	No	GCAGGAAAAAGAGAACATCACC	TGGCTTCCCGAGGCAG	58/58
miR-018	Si	TAAGGTGCATCTAGTGCAGATAG	GAAGGAGCACTTAGGGCAGT	53/55
miR-019a(p)	No	CCAATAATTCAAGCCAAGCA	CAGGCAGATTCTACATCGACA	55/55
miR-019b-1(p)	No	CCTGTCGCCCAATCAAA	CAACCTGTGTAGAAAGGGTT	55/55
miR-019b-2(p)	No	GGCACTTCCAGTACTCTTGGA	GTGTGTTACACAGACGTAGGA	56/55
miR-020	Si	GCACTAAAGTGCTTATAGTGCAG	GTACTTTAAGTGCTCATAATGCA	53/51
miR-021	Si	GCTTATCAGACTGATGTTGACTG	CAGCCCATCGACTGGTG	53/55
miR-022(p)	No	AGCAACATGCCCTGCTC	TCTGTACCTTCAGATGATG	54/55
miR-023a	Si	CTGGGGTTCCTGGGGAT	TGGTAATCCCTGGCAATGTG	57/58
miR-023b(p)	No	AAGCCCAGTGTGTGCAGAC	ACCACGGTTTCTGGAGGA	56/55
miR-024-1,2	Si	CTCCCGTGCCTACTGAGCT	CCCTGTTCTGCTGAACTGAG	57/59
miR-025	Si	TGAGAGGCGGAGACTTGG	TCAGACCGAGACAAGTGCAA	56/57
miR-026a-1,2	Si	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCTGT	TGCAAGTAACCAAGAATAGGCC	57/57
miR-026b	Si	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCTGT	CAAGTAATGGAGAACAGGCTG	57/54
miR-027a,b	Si	GCAGGGCTTAGCTGCTTG	GGCGGAACCTAGCCACTGT	56/56
miR-028	Si	GGAGCTCACAGTCTATTGAGTTACC	CCTCCAGGAGCTCACAATCT	56/56

FIG. 4 (continuación)

miR-029a,c	Si	ATGACTGATTCTTTTGGTG	ATAACCGATTTCAGATGGTG	49/51
miR-029b-1,2	No	TGGTTTCATATGGTGTTTA	ATAACCGATTTCAGATGGTG	50/51
miR-030a,e	Si	GTAAACATCCTCGACTGGAAGCT	GCTGCAACATCGACTGAA	58/58
miR-030a(p)	Si	AGGTAAACCAACAGAAGGCT	CCTTGAAGTCCGAGGCGAG	56/55
miR-030e(p)	Si	CCTCACTGCGTCTCGT	CCTGTGGGCACAAACCT	54/54
miR-030b	No	CATGTAAACATCCTACACTCAGCT	ATCCACCTCCAGCCAAAT	54/56
miR-030b(p)	Si	GTGAATGCTGTGCTGTTC	GCCTCTGTATACTATTCTTGCCA	54/54
miR-030c-1,2	Si	TGTGTAAACATCCTACACTCTCAG	GAGTAAACAAACCTCTCCA	53/53
miR-030c-1(p)	No	CAGTGGTCAGGGGCTGAT	GGAGTGGAGACTGTTCTTCT	55/54
miR-030c-2(p)	No	GACTGCCAACCCATCCTA	CCTCAGAAACAAACAGGGA	57/57
miR-030d	Si	GTTGTTGTAAACATCCCGAC	GCAGCAACATCTGACTGAAAG	56/56
miR-030d(p)	No	GCTGAAATGATGACTGGCA	CTCCACTCCGGACAGAA	56/56
miR-031(p)	Si	TGAGTGTGTTTCCCTCCCT	GCCATGGCTGCTGCTAG	56/56
miR-032	Si	GCACATTACTAAGTTGCATGTTG	TATCACACACATTAATTGCATTG	54/54
miR-033	Si	TGTGGTGCA TTGTAATTGCA	CTGTGATGCACTGTGGAAAC	56/54
miR-034a	Si	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTG	GGCAGTATACTTGTGATTGCTT	58/57
miR-034b	No	GCAGTGTCA TTAGCTGATTGTAC	GATGGCAGTGGAGTTAGTGAT	53/53
miR-034c	No	GCAGTGTAGTTAGCTGATTGCTAA	CCTGGCCGTGTGGTTAGT	55/56
miR-092-1	No	TCTACACAGTTGGGATCGG	CGGGACAAGTGCAATACCATA	57/57
miR-092-2(p)	No	ATGCGTATCTCCAGCACTCA	CCACCCGACAAACAGCAA	55/56
miR-093	Si	AAGTGCTGTTGTCGTCAGGT	CTCGGGAAGTGTAGCTCA	55/55
miR-095	No	GGCACTCAATAAATGTCTGTTGA	TGCTCAATAAATACCCGTTGA	56/55
miR-096(p)	No	AGAAGGCCCGCACCAGT	CTTGAGGAGGAGCAGGCT	55/54
miR-098	Si	GGTAGTAAGTTG TATTGTTGGG	TATAGTTATCTTAATTGGGGCC	54/54
miR-099a	Si	TAAACCCGTAGATCGATCTTG	CCACAGACAGAGCTTGTG	57/55
miR-099b	No	CCACCCGTAGAACCAGC	CCACAGACAGAGCTTGTG	57/56
miR-100	Si	AACCCGTAGATCCGAACCTG	TACCTATAGATACAAGCTTGTGG	55/55
miR-101-1	Si	GCCCTGGCTCAGTTATCACACA	GCCATCCTTCAGTTATCACAGTA	57/55
miR-101-2	Si	TTTTCGGTTATCATGGTACC	CCTTCAGTTATCACAGTACTGTACC	51/53
miR-103-1,2	Si	GCTTCTTTACAGTGTGCT	TTCATAGCCCTGTCAATGCT	54/54
miR-105-1,2	Si	CAATGCTCAGACTCTGTGGT	GCATGCTCAAAACATCCGT	58/58
miR-106a(p)	No	CTGCATGGA TCTGTGAGGAC	AGCAGCTCAAAAGCATCAAC	55/54
miR-106b	Si	TAAAGTGCTGACAGTGCAGATGTG	CAAGTACCCAGAGTGCCTG	57/56
miR-107	Si	CAGCTCTTTTACAGTGTGCT	GATAGCCCTGTACAATGCTGC	55/56
miR-108	Si	GGATTTTGTAGGGCATTATGAC	GAGGGACTTTCAGGGGCA	58/58
miR-122a	No	GGAGTGTGACAATGGTGTG	TTTAGTGTGATAATGGCTTTG	55/54
miR-124a-1,2,3	Si	TCCGTGTTACAGCGGAC	CATTACCCGCTGCTTA	58/58
miR-125a	Si	GTCCCTGAGACCCCTTAAC	AAOCTCACCTGTGACCTG	54/54
miR-125b-1	Si	GTCCCTGAGACCCCTAATTG	AGCTAAOCCGTGGATT	52/53
miR-125b-2	Si	GTCCCTGAGACCCCTAATTG	AAGAGCCTGACTTGTGATG	52/51
miR-126	Si	TATTACTTTTGGTACGCGCTG	GCGCATTATTACTCAAGGTAC	55/54
miR-127	Si	AGCCTGCTGAAGCTCAGAGG	GCCAACTCAGACGGATCC	59/59
miR-128a	Si	TGGATTCGGGGCCGTAG	AAAGAGACCGTTCACTGTGAG	59/57
miR-128b	Si	GGAAAGGGGGGCCGATA	AAAGAGACCGTTCACTGTGAG	58/57
miR-129-2	Si	CTTTTTCGGTCTGGGCT	GCTTTTTCGGGTAGGGCT	57/57
miR-130a(p)	No	TGAGTGGCCAGGGAC	GCAATGCTGAGGAGGCA	54/55
miR-130b	No	CCTGTTGCACTACTATAGGCCG	TGCCCTTTTAACATTGCACTG	58/57
miR-132	Si	AACCGTGGCTTTCGATTGTTA	CGACCATGGCTGTAGACTGTTAC	58/57
miR-133a-1,2	Si	CAGCTGGTAAATGGAACCAA	ACAGCTGTTGAAAGGGAC	57/56
miR-133b	Si	CTGGTCAACGGAACCAAG	ACAGCTGTTGAAAGGGAC	55/56
miR-134	Si	GTGACTGGTTGACCAGAGGG	GGTGAAGTGGTGCACACA	57/58
miR-135a-1,2	Si	CTATGGCTTTTATTCCTATGTA	CACGGCTCAATCCCTA	54/54
miR-135b(p)	No	GCTTCTCGCTTCCCTATGA	TCCGAACCTGGTCCCA	54/55
miR-136	Si	GGACTCCATTGTTTGTGATG	AGACTCATTTGAGACGATGAG	57/57
miR-137	Si	GTGACGGGTATTCTGGGT	GACTACGCTATTCTTAAGCAA	53/53
miR-138-1,2	Si	CAGCTGGTGTGTGAATCAG	ACCCTGGTGTCTGAAATAG	54/54
miR-139	Si	TTCTACAGTGCAGGTGTCTCA	TACTCCAACAGGGGCGC	58/57
miR-140	Si	CAGTGGTTTACCCTATGGTAGG	CGTGGTTCTACCTGTGGTAG	56/56
miR-141	Si	GTCCATCTCCAGTACAGTGTG	AGCCATCTTACCAGACAGTGT	55/54
miR-142(p)	No	TTGGAGCAGGAGTCAGGA	CGCCGAGGAAGATGGT	54/54
miR-143	Si	TGAGGTGCACTGCTGCATC	GCTACAGTGTCTTCACTCAGACTC	58/56
miR-144	Si	GCTGGGATATCATCATATCTG	CGGACTAGTACATCATCTACTG	50/49
miR-145(p)	No	GGATGCAGAAAGAACTCCA	CCTCATCTGTGAGCCAG	54/53
miR-146	Si	TTGAGAACTGAATTCATGG	GCTGAAGAACTGAATTCAGAG	52/52
miR-147	No	CTAAGACAACTTCTGCACAC	ATCTAGCAGAACTTTCCAC	53/53
miR-148a(p)	Si	GAGGAAGACAGCAGTTGGT	AAAGGCGCAGCGACGT	58/58
miR-148b(p)	Si	TCTGTCTAAGTCACCAATCTC	TCTATTCTTCCCTCCACTC	52/52
miR-149	Si	CTGGCTCCGTGCTTCACT	AGCACAGCCCGCTCC	57/59

miR-150	Si	GTCTCCCAACCCCTGTACCAG	TGTCCCCCAGGCCTGTAC	57/58
miR-151	Si	CTCGAGGAGCTCACAGTCTAG	GTCTCAAGGAGCTTCAGTC	53/53
miR-152	Si	GCCCAGGTTCTGTGATACACT	CCCAAGTTCTGTGATGCAC	55/53
miR-153-1,2	Si	CATTTTGTGATCTGCACTAGT	TCACTTTGTGACTATGCAACTG	55/54
miR-154	Si	TAGGTTATCCGTGTTGCCIT	AATAGGTCAACCGTGTATGATT	54/54
miR-155	No	GTTAATGCTAATCGTGATAGGG	GCTAATATGTAGGAGTCAGTTGGA	52/53
miR-181a,c	Si	AACATTCAACGCTGTCGGT	CAGTCAACGGTCAGTGGTT	55/55
miR-181b-1,2	Si	AACATTCAACGCTGTCGGT	TTGCATTCAATTGTCAGTGAG	55/53
miR-182	Si	TTTGGCAATGGTAGAAGTAC	GTTGGCAAGTCTAGAACCACC	54/55
miR-183	Si	GTATGGCACTGGTAGAATTAC	TATGGCCCTTCGGTAATT	53/54
miR-184	Si	CTTATCACTTTTCCAGCCCA	CCTTATCAGTTCTCGTCCA	54/54
miR-185	No	GGAGAGAAAGGCAGTTCCTG	GGACCAGAGGAAAGCCAG	55/54
miR-186(p)	No	CACCCATCATATTTCTCCCA	GACATTCACATGCTTCAGGTAG	54/54
miR-187	Si	CTCGGGCTACAACACAGGA	GCTGCAACACAAGACACGA	56/55
miR-188(p)	No	CCATATGTCGTGCCAAGAGA	CACATGCACAAGAGAGCAAG	56/54
miR-190	Si	GTGATATGTTGATATATTAGGTT	GGAATATGTTGATATATAGTTGG	49/49
miR-191	No	GCAACGGAATCCCAAAAG	GACGAAATCCAAGCGCA	55/55
miR-192	No	CTGACCTATGAATTGACAGCC	TGACCTATGGAATTGGCAG	54/53
miR-193	Si	GTCTTTGCGGGCGAGAT	AACTGGGACTTTGTAGGCCA	56/56
miR-194-1,2	No	TGTAACAGCAACTCCATGTG	TAACAGCATCTCCACTGGAA	52/53
miR-195(p)	No	GGAGTCITTTGTTGCCACA	GGCTCAGCCCTCCTC	56/55
miR-196a-1	No	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG	ATCGGGTGGTTAATGTTG	53/52
miR-196a-2	Si	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG	CAGTTTCTTGTGCGGAGTT	53/54
miR-196b	Si	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG	AGGCAGTGTCTGTCTGT	53/52
miR-197	Si	CTGTGCCGGGTAGAGAGG	ATGCTGGGTGGAGAAGGT	55/54
miR-198	No	GGTCCAGAGGGGAGATA	TTTATCTATAGAGAAGGAAGAAA	49/48
miR-199a-1(p)	Si	GTGGTGGTTTCTTGGCT	GGTGGTGGAAATGACACTC	54/54
miR-199a-2(p)	No	GGAGGCTTTTCTGAGGAC	CCCTAGTGTGCAAAACCTGT	54/55
miR-199b(p)	No	CACCGGATGGACAGACA	CGGTCCAGCTCTCCAGT	53/53
miR-200a(p)	No	TTCCACAGCAGCCCTG	GATGTGCTCGGTGGTGT	58/56
miR-200b	Si	CATCTTACTGGGCAGCATTG	GTCATCATTACCAGGCAGTATTAG	55/54
miR-200c	Si	CTCGTCTTACCAGCAGTGT	GTCATCATTACCAGGCAGTATTAG	54/54
miR-203	Si	TCCAGTGTTCTTAACAGTTCA	GGTCTAGTGGTCTAAACATTC	54/53
miR-204	Si	CCCTTTGTATCCTATGCCCT	GTCCCTTTGCCCTTCCA	55/55
miR-205	Si	CCTTCATTCCACCGGAGT	GAACCTCACTCCACTGAAATCTG	54/54
miR-206	Si	ACATGCTTCTTTATATCCCA	AAACCACACACTTCTTACATTC	53/54
miR-208	Si	AGCTTTTGGCCCGGGT	CCAACAAGCTTTTGTCTGTC	59/59
miR-210	Si	CCTGCCACCGCACACT	AGCGCTGTCCACGCA	60/60
miR-211	Si	CCCTTTGTATCCTTCCGCT	CCCTTTGTCTGTCCTG	56/56
miR-212	Si	CACCTTGGCTCTAGACTGCTT	GCCGTGACTGGAGACTGTTA	55/55
miR-213	Si	GAACATTCAACGCTGTGCGT	GTACAATCAACGGTCGATGGT	57/56
miR-214	Si	TCTGCCTGTCTACACTTGCTG	TGACTGCCTGTCTGTGCT	55/56
miR-215	No	ATGACCTATGAATTGACAGCAA	TTGGCCTAAAGAAATGACAGAC	53/55
miR-216	Si	TGGCTTAATCTCAGCTGGCA	TGAGGGCTAGGAAATGCTCT	58/58
miR-217	Si	GATACTGCATCAGGAAGTATTG	GGCAATGCATTAGGAAGTAT	55/55
miR-218-1,2	Si	GTGCTTGATCTAACCATGTGGT	GTGCTTGACGGAACCATGTT	55/57
miR-219-1,2	Si	TCCTGATTCTCAAACGCAA	GGGACGTCCAGACTCAACTCTC	59/59
miR-220	Si	CCACACCGTATCTGACACTTT	CAGACCGCATCATGAACAC	54/54
miR-221	Si	CCTGGCATACAATGTAGATTTCT	AAACCAGCAGACAATGTAGCT	57/57
miR-222(p)	No	CCCAGAAGGCAAGGAT	CTCTCTCAGGACACTGAAGCAG	56/56
miR-223	Si	CCGTGTATTTGACAAGCTGAGT	TGGGGTATTTGACAACTGACA	56/57
miR-224	Si	GGCTTTCAAGTCACTAGTGGTTC	CTTTGTAGTCACTAGGGCACCA	56/56
miR-296	Si	CCCCCCTCAATCCTGT	GGAGAGCCTCCACCCAAC	57/57
miR-299(n)	No	ACCACCATCGTGCGGTA	GTTTGATGGCTGGGCT	55/55
miR-301	Si	GCTCTGACTTATTGCACTACTG	GCTTTGACAATACTATTGCACTG	53/53
miR-302	Si	CCACTTAAACGTGGATGTACTTG	TCACCAAAACATGGAAGCAC	55/56
miR-302b	Si	CAACTTAAACATGGAAGTGCTTT	CCTACTAAAACATGGAAGCACTTAC	54/55
miR-302c	No	GCTTTAACATGGGGGTACCT	TCACCAAAACATGGAAGCAC	54/56
miR-302d	Si	TCTACTTTAACAAGGAGCACTT	TCACCAAAACATGGAAGCAC	54/56
miR-320	Si	CGCCITCTCTTCCCGGT	TTCCGCCCTCAACCCA	57/57
miR-321	Si	CTAAGCCAGGGATTGTGGG	CTTTACCCCGGGTGGG	57/56
miR-323	Si	AGAGGTGGTCCGTGGCG	GAGGTGACCGGTGTAATGTGC	59/59
miR-324(p)	Si	CATTGCTGTCTCTCTCGCA	TGGGGCTTTCTTCCCAG	56/56
miR-325	Si	CCTAGTAGGTGTCCAGTAAGTGT	GATAGGAGGTCTCAATAAACA	51/52
miR-326(p)	No	CGGGACTCCATCAAGAA	CTGGAAGCTGAAGCTGCAT	55/55
miR-328	Si	GAGGGCTCAGGAGAGAAAG	GGACGGAAGGGCAGAGA	57/56
miR-330	Si	CTGGGCTGTGTCTTAGGCT	TGCAGGCGGTGTGCTTT	58/58
miR-331(p)	No	GAGCTGAAAGCACTCCCAA	CACACTCTTGATGTTCCAGGA	55/55
miR-335	Si	GTCAAGAGCAATAACGAAAAATG	GAGGTCAGGAGCAATAATGAA	55/53
miR-337	No	ACGGCTTCATACAGGAGTTG	GGCATCATATAGGAGCTGGA	54/54
miR-338	Si	CCAACAATATCCTGGTGTGCTGAG	CAACAAAATCACTGATGTGCTGGA	58/57

miR-339	Si	TCCCTGTCTCCAGGAGCT	TCTGTCGTCGAGGCGCT	58/58
miR-340	Si	ATAAAGCAATGAGACTGATTGTC	GGCTATAAAGTAACTGAGACGGA	52/54
miR-342	Si	GTGCTATCTGTGATTGAGGGA	CGGGTGCGATTTCTGTG	54/55
miR-345	No	CTGACTCCTAGTCCAGGGCT	CTCCAGACCCCTCGTTCA	55/56
miR-346	No	GCATGCCTGCCTCTCTGTTG	TGCCCAGGCAGCTGCA	61/61
miR-361	Si	CTTATCAGAATCTCCAGGGGTAC	GCAAAATCAGAATCACACCTG	55/53
miR-367	Si	CTGTTGCTAATATGCAACTCTG	CACCATTTGCTAAAGTGCAAT	52/53
miR-368	Si	GGTGGATATTCCTTCTATGTTTATG	AAAGTGGAATTTCTCTATGTT	54/53
miR-369	No	GGAGATCGACCGTGTATATTTC	GAAAAGATCAACCATGTATTATTC	54/55
miR-370	Si	GGTCAAGTCTCTGCAGTTACA	ACCAGGTTCCACCCAG	55/55
miR-371	Si	TCAAACTGTGGGGGCACTT	ACACTCAAAAGATGGCGGC	58/57
miR-372	Si	GCCTCAAATGTGGAGCACTATT	TCAAATGTGCGAGCACTTTC	57/56
miR-373	No	CTCAAAATGGGGGCGCTT	CACCCCAAAATCGAAGCACT	60/59
miR-374(p)	No	GCCCTCAAGGAGCTCACAGT	CACCCCTGGGAAGAAATTT	58/59
miR-375	Si	ACGAGCCCTCGCACA	CCTCACGCGAGCCGAAC	58/60
miR-376a	Si	GGTAGATTCTCCTTCTATGAGTAC	ACGTGGATTTTCTCTATG	49/49
miR-377	Si	GAGCAGAGGTTGCCCTTG	ACAAAAGTTGCCCTTGTGTGA	55/55
miR-378	Si	CTCCTGACTCCAGGTCCTGT	GCCTTCTGACTCCAAGTCCA	55/56
miR-379	Si	AGAGATGGTAGACTATGGAACGT	GTGGACCATGTTACATAGGTGAG	53/55
miR-380	Si	GATGGTTGACCATAGAACATG	GATGTGGACCATATTACATACGA	52/53
miR-381	Si	AGCGAGGTTGCCCTTG	ACAGAGAGCTTGCCCTTGTATA	56/55
miR-382	Si	GAAGTTGTTGTTGGTGGATTTC	AAGTGTGTTGTTGGTGAATGATTTC	56/55
miR-383	Si	CAGATCAGAAGGTGATTGTGGCT	TTCTGACCAGGCAGTGCTGT	59/58
miR-384	No	CAATTCCTAGACAATAATGATAATG	GTCATTCTAGAAATTTGTTGATA	49/50
miR-422b	Si	TCCTGACTCCAGGTCCTGT	GGCCTTCTGACTCCAAGTC	54/53
miR-423	Si	TGAGGGGCGAGAGCGGA	GAGGGGCTCAGACCGA	58/58
miR-424	Si	AGCAGCAATTCATGTTTGAAG	GCAGCGCTCACGTTTT	56/57
miR-425	Si	ATGACACGATCACTCCCGTTG	GGCGGACACGACATTC	59/57
let7a-l	Si	AGGTAGTAGGTTGTATAGTTTAGG	TAGGAAAGACAGTAGATTGTATA	49/48
let7a-l(p)*	No	CCTGGATGTTCTCTTCACTG	GCCTGGATGCAGACTTTTCT	60/60
let7a-2	Si	GAGGTAGTAGGTTGTATAGTTAG	AAAGCTAGGAGGCTGTACA	49/49
let7a-2(p)*	Si	TTCCAGCCATTGTGACTGCA	CTCACCATTGTTTGTAGTGC	60/58
let7a-3	Si	GAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTGG	GGAAAGACAGTAGATTGTATAGT	50/49
let7a-3(p)*	No	ACCAAGACCGACTGCCCTTT	CTCTGTCCACCGCAGATATT	62/60
let7b	Si	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGT	GGAAGGCAGTAGGTTGTATAG	51/50
let7b(p)	Si	CCTCCGCGAGTGCAAG	CATGGGGTCTGTCACTG	56/55
let7c	Si	TTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT	GGAAAGCTAGAAGGTTGTACAG	51/52
let7c(p)	Si	TTGGAGGAGCTGACTGAAGA	AAGAATTCCTCGACGGCTC	55/56
let7d	Si	AGGTTGCATAGTTTATAGGGCA	AAGGCAGCAGGTCGTATAGT	55/53
let7d(p)	No	GCCAAGTAGAAGACCAGCAAG	CAAGGAAACAGGTTATCGGTG	56/56
let7e	Si	GAGGTAGGAGGTTGTATAGTTGAG	GAAAGCTAGGAGGCCGTATAG	52/54
let7e(p)	No	CTGTCTGTCTGTCTGTC	AGAAAAGAGCCCGGCTCTT	57/57
let7f-1	Si	GATTGTATAGTTGTGGGAGTAGTG	GGGAAGGCAATAGATTGTATAG	52/51
let7f-1(p)*	Si	TGTACTTTCCATTCCAGAAG	TAATGCAGCAAGTCTACTCC	56/58
let7f-2	Si	GGTAGTAGATTGTATAGTTTAGGG	GGGAAAGACAGTAGACTGTATAG	49/50
let7f-2(p)*	Si	TGAAGATGGACACTGGTGCT	CAGTCGGAGAAGAAGTGTAC	60/60
let7g	Si	GTAGTAGTTTGTACAGTTTGAAGG	GGCAGTGGCCTGTACAGT	52/53
let7g(p)	No	AGCGCTCCGTTTCTTTT	CCCCAC1TGGCAGCTG	56/55
let7i	Si	TGTGCTGTTGGTCGGGT	GCAGTAGCTTGCAGAGTT	55/54
let7i(p)	Si	CGAGGAAGGACGGAGGA	GCTGAGCATCACCAGCAC	56/55

* Secuencia de cebador idéntica a la indicada en Takamizawa, J., H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi, y T. Takahashi, Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res, 2004. 64 (11): p. 3753-6.

FIG. 5

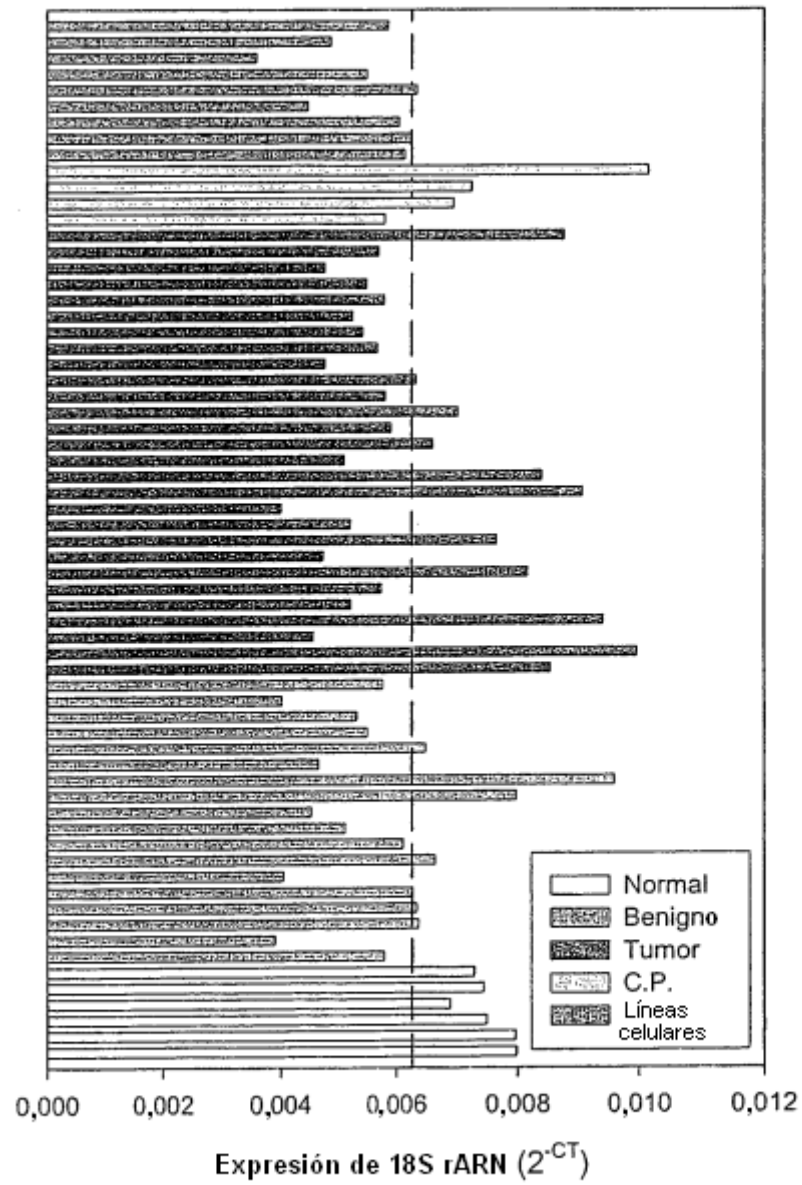


FIG. 6

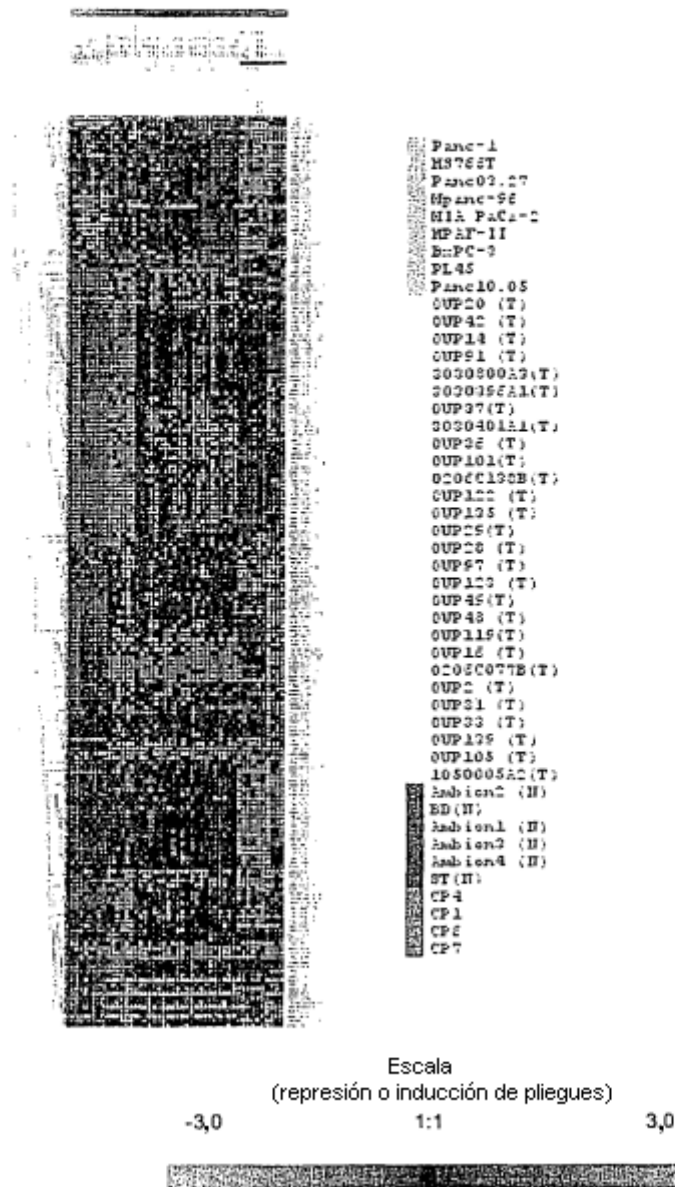


FIG. 7

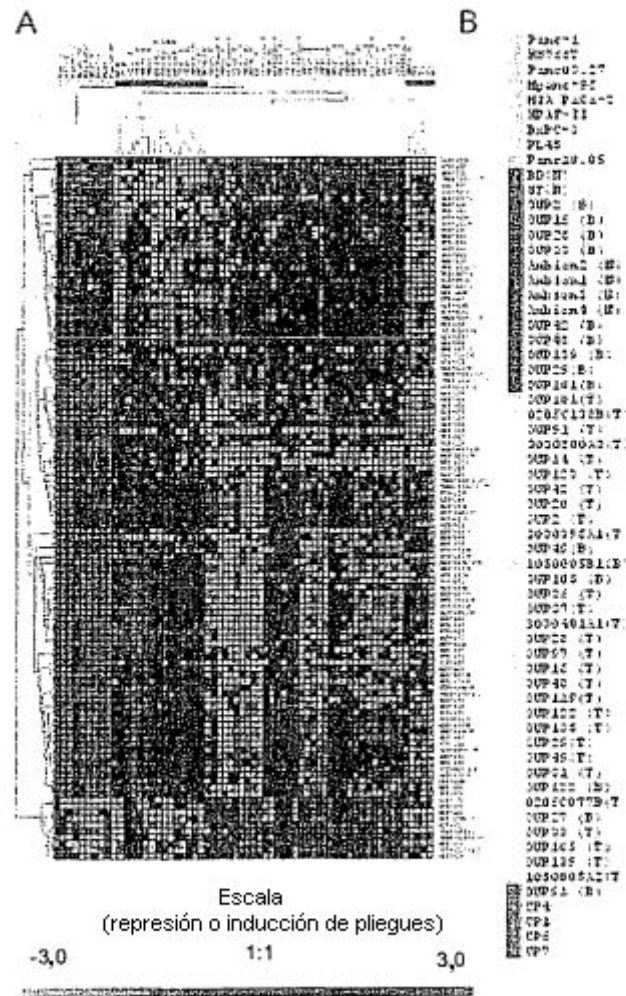


FIG. 8

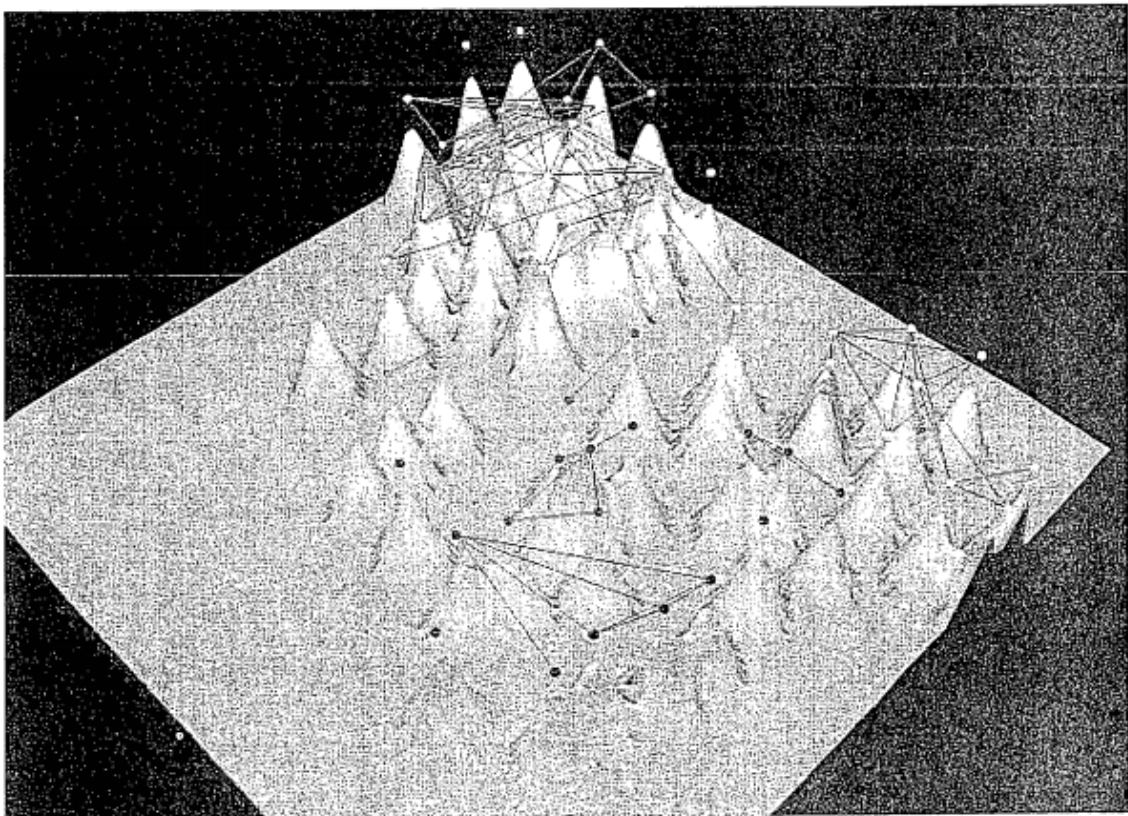


FIG. 9

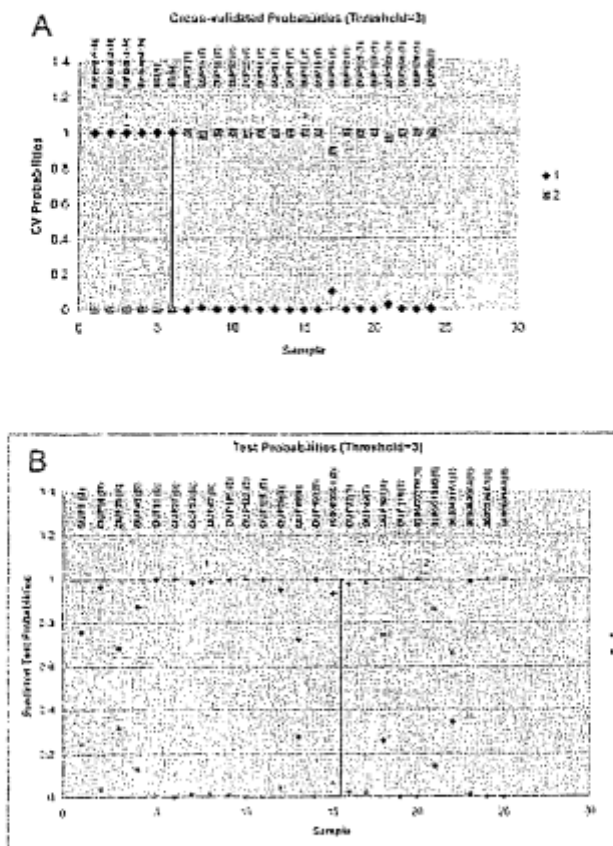


FIG. 10

Fig. 10. 60 precursores principales de miARN expresados de forma anómala en adenocarcinoma de páncreas										
clasificación	miARN	Puntuación 1	Puntuación 2	Valor de p (precursores)	Expresión	miARN Maduro validado por ensayo con PCR **	Clonado a partir de páncreas	miARN alterado en otros cánceres humanos	Referencia	
PAM					Tumoral					
					con respecto a páncreas normal/benigno					
1	MIR-221	-1,101	0,2359	2,37557E-06	Aumento	Si		Si	He H., et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA.	
2	MIR-424	-1,0735	0,23	0,000226727	Aumento					
3	MIR-301	-1,0227	0,2191	7,41253E-05	Aumento	Si				
4	MIR-100	-0,9729	0,2085	1,17007E-05	Aumento	Si				
5	MIR-376	-0,9275	0,1987	8,8011E-05	Aumento	Si	Si			
6	MIR-125b-1	-0,7191	0,1541	2,49828E-05	Aumento	Si				
7	MIR-021	-0,693	0,1485	9,22837E-07	Aumento	Si		Si	Iorio M. V., et al. (2005) Cancer Res 65, 7065-70.	
8	MJR-345	0,6885	-0,1475	1,59815E-11	Disminución	No				
9	MIR-016-1	0,6362	0,1363	3,6197E-	Aumento	Si		Si	Calin G. A., et al. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A 101, 11755-60.	
10	MIR-181a,c	-0,6185	0,1325	0,000127985	Aumento	Si				
11	MIR-092-1	-0,5829	0,1249	0,000596614	Aumento			Si	He L., et al. (2005) Nature 435, 828-33	
12	MIR-015b	-0,5165	0,1107	0,000116168	Aumento	Si		Si		
13	MIR-142-P	0,5074	-0,1087	4,98386E-06	Disminución	No			Calin G. A., et al. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A 101, 11755-60.	
14	MIR-155	-0,48	0,1029	0,000445572	Aumento	Si		Si	Eis P. S., et al. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A 102, 3627-32.	
15	let-7f-1*	-0,4471	0,0958	0,000125559	Aumento	Si		Si	Takamizawa, J. et al. (2004) Cancer Res 64, 3753-6.	
16	MIR-212	-0,4413	0,0946	0,002391288	Aumento	Si				
17	MIR-107	-0,4254	0,0912	8,58921 E-	Aumento					
18	MIR-024-1,2	0,4042	0,0866	0,00013015	Aumento	Si				
19	let-7d*	-0,3999	0,0857	4,32488E-05	Aumento	Si		Si	Takamizawa, J. et al. (2004) Cancer Res 64, 3753-6.	
20	MIR-139	0,3751	-0,0804	1,77174E-09	Disminución					
21	MIR-328	0,3584	-0,0768	5,05748E-07	Disminución	No				
22	MIR-019b-1-P	0,3537	-0,0758	3,18957E-06	Disminución	No		Si	He L., et al. (2005) Nature 435, 828-33.	
23	MIR-023a	-0,347	0,0744	4,46272E-05	Aumento	Si				
24	MIR-331-P	0,3272	-0,0701	1,42823E-06	Disminución	No				
25	MIR-132	-0,3203	0,0686	0,002384032	Aumento	Si				
26	let-7b*	-0,3191	0,0684	0,003503124	Aumento	Si		Si	Takamizawa, J. et al. (2004) Cancer Res 64, 3753-6.	
27	let-7i*	-0,3034	0,065	0,000218555	Aumento	Si		Si	Takamizawa, J. et al. (2004) Cancer Res 64, 3753-6.	

FIG. 10

28	MIR-133b	0,2928	-0,0627	3,83568E-08	Disminución			
29	MIR-096-P	0,2918	-0,0625	2,40159E-08	Disminución			
30	MIR-423	0,2719	-0,0583	2,84344E-08	Disminución			
31	MIR-192	0,2675	-0,0573	2,25525E-07	Disminución			
32	MIR-222-P	-0,2587	0,0554	0,002287799	Aumento	Si	Si	He, H., et al. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A.
33	MIR-029a,c	-0,2289	0,049	7,92369E-05	Aumento			
34	MIR-367	-0,1838	0,0394	0,141720074	Aumento			
35	MIR-215	-0,1833	0,0393	0,000321492	Aumento			
36	MIR-001-2	-0,1763	0,0376	4,76206E-06	Aumento			
37	MIR-129-2	0,1628	-0,0349	1,5935E-08	Disminución			
38	MIR-204	0,1552	-0,0332	4,25409E-06	Disminución			
39	MIR-422b	0,1544	-0,0331	3,42739E-06	Disminución			
40	MIR-145-P	-0,1505	0,0323	0,001587614	Aumento			
41	MIR-218-1,2	-0,1503	0,0322	0,002252216	Aumento			
42	MIR-098	-0,1483	0,0318	3,96929E-05	Aumento			
43	MIR-007-1	-0,1466	0,0314	0,001685476	Aumento			
44	MIR-152	-0,1438	0,0308	0,003889725	Aumento			
45	MIR-378	0,1393	-0,0298	0,000373924	Disminución	Si		
46	MIR-130a-P	0,1352	-0,029	5,98031E-09	Disminución			
47	MIR-302d	0,1312	-0,0281	0,000294202	Disminución			
48	MIR-126	-0,1178	0,0253	0,000250903	Aumento			
49	MIR-371	0,1173	-0,0251	2,65452E-07	Disminución			
50	MIR-299-P	0,1009	-0,0216	3,42811E-07	Disminución			
51	MIR-337	0,1005	-0,0215	2,38018E-06	Disminución			
52	MIR-383	0,0982	-0,021	1,46738E-07	Disminución	Si		
53	MIR-136	-0,0906	0,0194	0,139713028	Aumento			
54	MIR-034b	0,0767	-0,0164	0,00094286	Disminución			
55	MIR-200a-P	0,0722	-0,0155	3,89547E-05	Disminución			
56	MIR-210	0,0558	-0,012	7,82739E-07	Disminución			
57	let-7a-2-P	-0,0476	0,0102	0,000719438	Aumento		Si	Takamizawa, J. et al. (2004) Cancer Res 64, 3753-6.
58	let-7c*	-0,0437	0,0094	0,11360659	Aumento		Si	Takamizawa, J. et al. (2004) Cancer Res 64, 3753-6.
59	MIR-213	-0,0364	0,0078	0,000853434	Aumento			
60	MIR-196a-2	-0,0362	0,0078	0,023108113	Aumento			
61	MIR-032	-0,0322	0,0069	0,006334395	Aumento			
62	MIR-188b-P	0,0275	-0,0059	0,002459296	Disminución			

FIG. 10

63	MIR-092-2-P	0,0266	-0,0057	0,019779513	Disminución			
64	MIR-099a	-0,0262	0,0056	0,003697304	Aumento			
65	MIR-027a, b	-0,02	0,0043	0,001526337	Aumento			
66	MIR-128a	-0,0141	0,003	0,001292581	Aumento			
67	MIR-015a	-0,0016	0,0003	0,002302981	Aumento	Si	Si	Calin G. A., et al. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A 101, 11755-60.
68	MIR-030d	-0,0002	0	0,137026338	Aumento			
*	MIR-375				Disminución	Si	Si	
* Precursor de microARN no clasificado entre los 68 principales por PAM								
Si: Tasa de cambio en la expresión entre miARN precursor y miARN maduro en la misma dirección.								
No: tasa de cambio en la expresión entre miARN precursor y miARN maduro en la dirección opuesta.								

FIG. 11

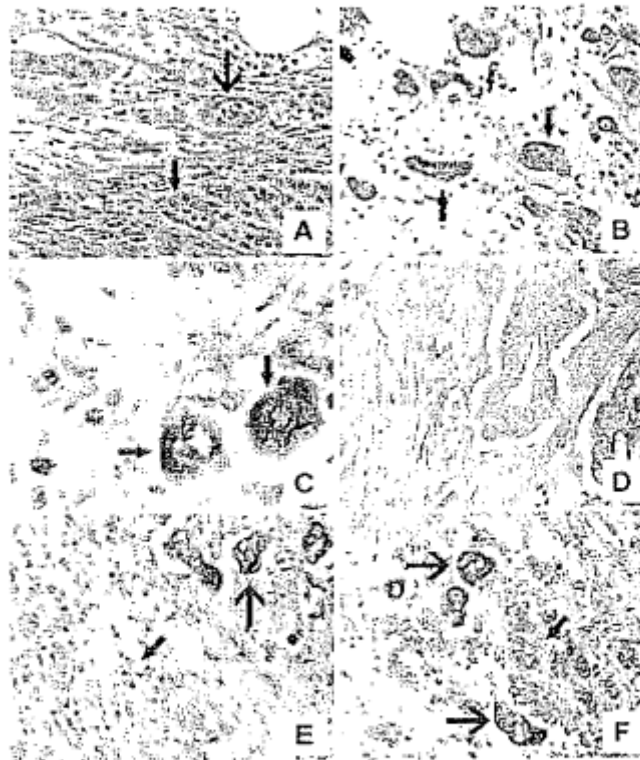


FIG. 12

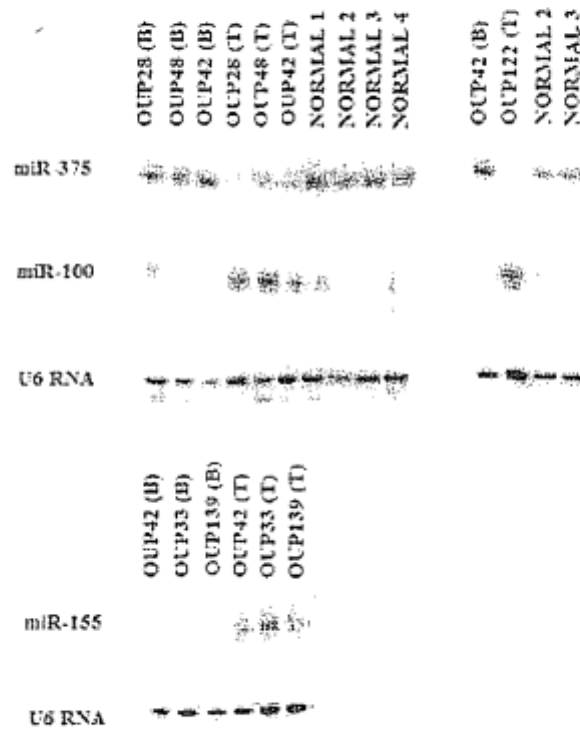


FIG. 13

Validación de expresión de miARN maduro y precursor,

Validado	miARN maduro	Tasa de cambio	Valor de P	miARN precursores	Tasa de cambio	Valor de P
Si	let7b	1,35	0,005587	let-7b	2,17	0,007128
Si	let7d	3,49	1,19E-09	let-7d	4,10	0,000186
Si	let7f	117,82	0,034908	let-7f-1	3,62	0,00032
				let-7f-2	1,31	0,27685
Si	let7i	7,94	2,49E-09	let-7i	4,34	0,000131
Si	MIR-015a	2,71	2,04E-10	MIR-015a	2,15	0,009189
Si	MIR-015b	3,47	8,91E-12	MIR-015b	3,30	0,000341
Si	MIR-016	2,63	2,27E-08	MIR-016-1	4,39 -	0,000433
				MIR-016-2	2,16	0,002543
No	MIR-019b	2,61	3,21E-08	MIR-019b-1-P	-11,81 -	0,000181
				MIR-019b-2-P	1,11	0,785195
Si	MIR-021	11,05	4,34E-10	MIR-021	8,92	2,74E-06
Si	MIR-023a	8,44	4,82E-08	MIR-023a	3,20	2,69E-06
Si	MIR-024	4,41	2,83E-09	MIR-024-1,2	3,03	6,22E-05
Si	MIR-100	8,69	1,2E-06	MIR-100	14,04	0,000353
Si	MIR-125b	5,83	3,69E-06	MIR-125b-1	9,56	0,000714
				MIR-125b-2	3,07	0,034242
Si	MIR-132	3,80	1,46E-07	MIR-132	5,99	0,001135
No	MIR-142-3P	11-34	1,39E-06	MIR-142-P	-10,88	0,001167
No	MIR-142-5P	10,11	4,45E-08			
Si	MIR-155	14,11	2,47E-06	MIR-155	13,31	0,000638
Si	MIR-181a	13,28	5,23E-10	MIR-181a,c	6,61	0,00044
Si	MIR-181c	3,07	1,68E-08			
Si	MIR-212	4,54	7,1E-08	MIR-212	8,53	0,002368
Si	MIR-221	6,00	1,66E-08	MIR-221	10,63	7,39E-05
Si	MIR-301	6,08	7,99E-10	MIR-301	4,53	0,000105
No	MIR-328	2,78	0,000187	MIR-328	-10,19	0,000293
No	MIR-331	4,45	6,75E-09	MIR-331-P	-14,55	0,000639
No	MIR-345	6,34	1,07E-08	MIR-345	-21,00	2,79E-06
Si	MIR-375	-3,33	9,47E-08	MIR-375	-7,33	5,02E-05
Si	MIR-376a	4,26	1,16E-06	MIR-376	4,05	0,000308

El análisis de PCR en tiempo real se realizó en cada una de las muestras que se enumeran en la Figura 6 (6 páncreas normales, 16 adenocarcinomas de páncreas y 10 tejidos benignos adyacentes).

FIG. 14

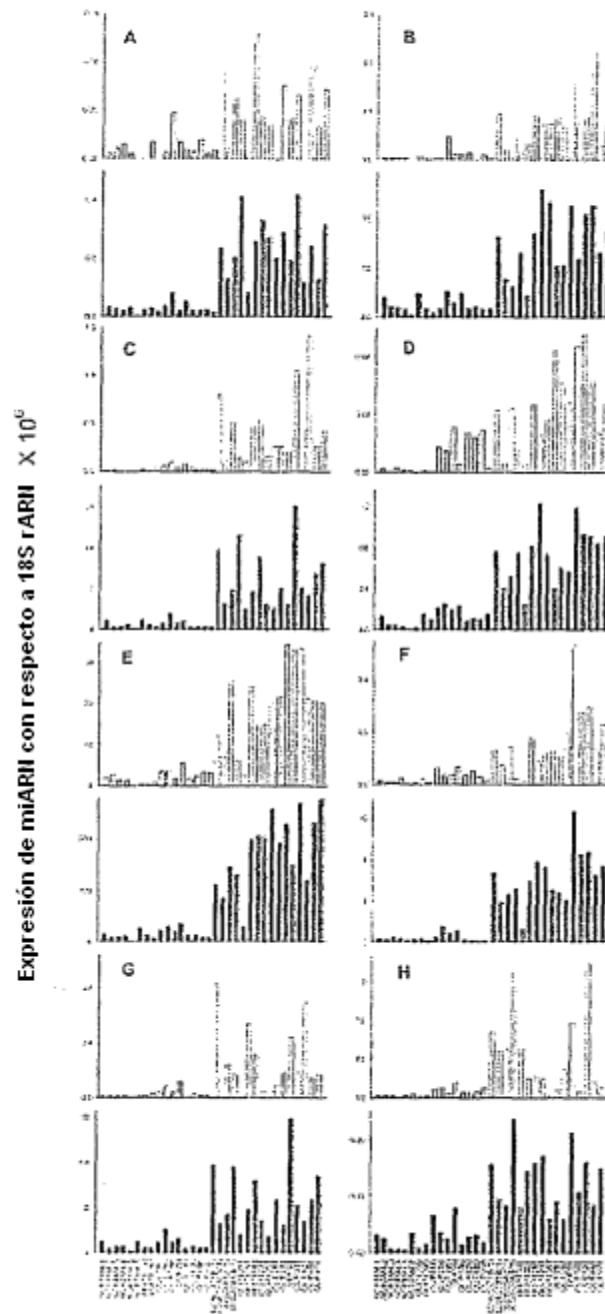


FIG. 15

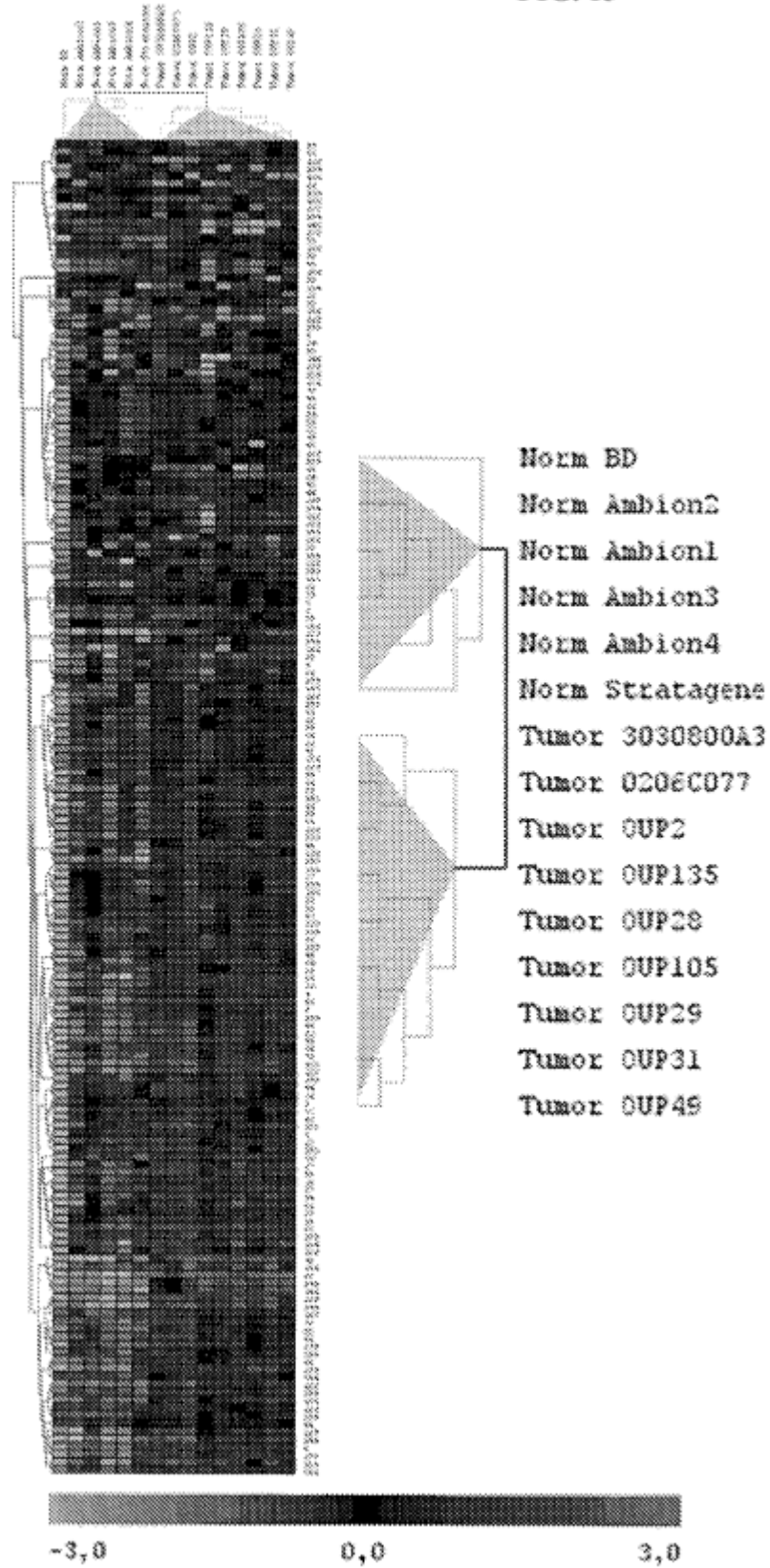


FIG. 16

miARN	Tasa de cambio valor de P		miARN	Tasa de cambio valor de P	
miARN con expresión reducida en cáncer					
hsa-miR-148a	-5,98	0,0018			
hsa-miR-216*	ND*	0,05			
hsa-miR-217	-10,5	0,0001			
hsa-miR-375	-2,84	0,0035			
hsa-miR-377	-6,21	0,0027			
* Expresión en todos los tumores igual a cero					
miARN con expresión aumentada en cáncer					
hsa-let-7c	4,40	0,01328	hsa-miR-181a	8,45	0,00018
hsa-let-7d	4,49	0,00004	hsa-miR-181b	3,86	0,01449
hsa-let-7e	4,07	0,00002	hsa-miR-181c	5,08	0,00021
hsa-let-7f	3,97	0,00268	hsa-miR-181d	4,32	0,00041
hsa-let-7g	2,52	0,00041	hsa-miR-183	2,11	0,04425
hsa-let-7i	7,74	0,00000	hsa-miR-186	4,45	0,00084
hsa-miR-009*	4,42	0,01291	hsa-miR-189	3,55	0,01402
hsa-miR-010a	4,33	0,00223	hsa-miR-190	2,61	0,01972
hsa-miR-010b	5,37	0,00001	hsa-miR-191	4,81	0,00020
hsa-miR-015a	3,36	0,00000	hsa-miR-192	3,29	0,02378
hsa-miR-016	4,34	0,00059	hsa-miR-193	4,90	0,00003
hsa-miR-017-3p	2,54	0,00212	hsa-miR-194	5,54	0,01875
hsa-miR-017-5p	4,36	0,00000	hsa-miR-195	4,15	0,00851
hsa-miR-018	5,06	0,00002	hsa-miR-196a	36,1	0,01050
hsa-miR-020	2,79	0,00004	hsa-miR-199a*	15,2	0,00019
hsa-miR-021	7,45	0,00002	hsa-miR-199b	8,46	0,00241
hsa-miR-022	4,88	0,00004	hsa-miR-200a	3,16	0,03648
hsa-miR-023a	10,2	0,00000	hsa-miR-200b	4,13	0,00589
hsa-miR-023b	2,81	0,00551	hsa-miR-203	10,4	0,02506
hsa-miR-024	6,37	0,00017	hsa-miR-210	43,4	0,03159
hsa-miR-026a	3,30	0,00831	hsa-miR-212	5,05	0,00042
hsa-miR-027a	4,33	0,00039	hsa-miR-213	31,8	0,00012
hsa-miR-027b	2,60	0,01114	hsa-miR-214	18,2	0,00132
hsa-miR-028	2,20	0,03715	hsa-miR-218	2,82	0,04943
hsa-miR-029b	3,98	0,00080	hsa-miR-221	3,20	0,00081
hsa-miR-030e-3p	2,28	0,00543	hsa-miR-222	10,3	0,00021
hsa-miR-031	39,7	0,00455	hsa-miR-223	10,2	0,00473
hsa-miR-034a	3,93	0,00043	hsa-miR-296	2,94	0,00102
hsa-miR-034b	3,81	0,00167	hsa-miR-301	10,8	0,00000
hsa-miR-034c	4,45	0,01815	hsa-miR-324-3p	6,37	0,00013
hsa-miR-093	5,81	0,00005	hsa-miR-324-5p	4,45	0,02280
hsa-miR-098	3,07	0,00040	hsa-miR-330	2,82	0,02131
hsa-miR-099a	11,4	0,00284	hsa-miR-331	6,64	0,00126
hsa-miR-099b	2,29	0,01250	hsa-miR-338	2,48	0,02590
hsa-miR-100	10,5	0,00125	hsa-miR-339	2,40	0,01012
hsa-miR-101	4,57	0,00051	hsa-miR-340	4,16	0,00095
hsa-miR-103	2,86	0,00145	hsa-miR-342	8,92	0,00000
hsa-miR-106b	5,33	0,00005	hsa-miR-345	2,81	0,00988
hsa-miR-125a	2,14	0,01792	hsa-miR-346	5,46	0,01574
hsa-miR-125b	8,92	0,00438	hsa-miR-361	3,44	0,00040
hsa-miR-126	3,73	0,01048	hsa-miR-370	4,47	0,00002
hsa-miR-126*	3,00	0,00745	hsa-miR-372	3,44	0,00027
hsa-miR-127	5,74	0,00077	hsa-miR-374	4,94	0,00016
hsa-miR-130a	7,07	0,00028	hsa-miR-376a	4,26	0,00291
hsa-miR-132	5,30	0,00110	hsa-miR-378	2,06	0,00628
hsa-miR-135b	43,8	0,00168	hsa-miR-379	3,60	0,00033
hsa-miR-140	5,69	0,00208	hsa-miR-382	3,48	0,00038
hsa-miR-142-3p	7,41	0,00000	hsa-miR-422b	2,24	0,00649
hsa-miR-142-5p	8,81	0,00004	hsa-miR-423	2,86	0,00002
hsa-miR-143	5,01	0,00161	hsa-miR-425	4,52	0,00007
hsa-miR-145	6,02	0,00293			
hsa-miR-146	12,4	0,00000			
hsa-miR-146b	6,57	0,00012			
hsa-miR-148b	2,87	0,00116			
hsa-miR-149	4,34	0,01779			
hsa-miR-150	6,92	0,02051			
hsa-miR-152	3,15	0,00387			
hsa-miR-155	19,6	0,00001			

FIG. 17

