

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 018**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2007 E 07716208 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 1968622**

54 Título: **Anomalías de la expresión de microARN en tumores pancreáticos endocrinos y acinares**

30 Prioridad:

05.01.2006 US 756502 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2014

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
1524 North High Street
Columbus, OH 43201, US**

72 Inventor/es:

**CROCE, CARLO M. y
CALIN, GEORGE A.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 524 018 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

Anomalías de la expresión de microARN en tumores pancreáticos endocrinos y acinares

5 **Apoyo gubernamental**

La invención fue subvencionada, en todo o en parte, por los Proyectos Programados de Subvenciones P01CA76259 y P01CA81534 del Instituto Nacional del Cáncer. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

10 **Antecedentes de la Invención**

Los cánceres pancreáticos se pueden clasificar según el sitio donde se encuentre el cáncer en el páncreas o según el tipo de célula a partir del que se ha generado el cáncer. El cáncer pancreático puede producirse en la cabeza, cuerpo o cola del páncreas y los síntomas pueden variar dependiendo de dónde se localice el tumor en el páncreas. El 70-80 % de los cánceres pancreáticos se producen en la cabeza del páncreas. La mayoría de los cánceres del páncreas son de tipo exocrino, y más del 90 % de estos cánceres pancreáticos exocrinos son adenocarcinomas. Casi todos de estos son adenocarcinomas ductales, en los que el cáncer se produce en las células del revestimiento de los conductos del páncreas. Además, hay tipos más raros de cáncer pancreático, tales como los tumores quísticos, el cáncer de células acinares y los sarcomas. Los tumores quísticos son tumores que producen un quiste o saco lleno de fluido en el páncreas. Los sarcomas, cánceres del tejido conjuntivo que mantiene juntas las células del páncreas, son raros y a menudo se producen en niños.

Además de los cánceres exocrinos, se pueden producir cánceres endocrinos. Los cánceres endocrinos se pueden denominar en referencia a la hormona que producen, por ejemplo gastrinomas (que producen gastrina), insulinomas (que producen insulina), somatostatonomas (que producen somatostatina), VIPomas (que producen VIP) y glucagonomas (que producen glucagón). Además, pueden producirse linfomas en el páncreas, aunque son raros.

Los tumores pancreáticos endocrinos (PET) se pueden producir esporádicamente o como parte de un síndrome neoplásico endocrino múltiple tipo 1 (MEN1) (Kloppel, G., y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1014:13-27 (2004)). Estas neoplasias se clasifican clínicamente como funcionales (F-PET) o no funcionales (NF-PET), según la presencia de síntomas debidos a la hipersecreción hormonal. Los F-PET están representados mayoritariamente por insulinomas. En cuanto al diagnóstico; se observa enfermedad metastásica en solo el 10 % de los insulinomas pero hasta el 60 % en NF-PET, y la mayoría de las muertes relacionadas con PET se producen por metástasis hepáticas (Kloppel, G., y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1014:13-27 (2004)). El potencial de malignidad entre los PET varía mucho y no se puede predecir basándose en la apariencia histológica. De hecho, la inmensa mayoría de los PET son tumores endocrinos bien diferenciados (WDET) y se definen como carcinomas endocrinos bien diferenciados (WDEC) solo cuando se identifica la invasión o metástasis (Kloppel, G., y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1014:13-27 (2004)).

El carcinoma pancreático celular acinar (PACC) es un tipo de tumor extremadamente raro, distinto del adenocarcinoma ductal y PET, aunque se observa cierto solapamiento con PET por la expresión de ambos marcadores neuroendocrinos en un tercio de los casos y la existencia de carcinomas mixtos acinares-endocrinos (Ohike, N., y col., Virchows Arch. 445:231-35 (2004)). El PACC siempre es maligno con una supervivencia media de 18 meses, que lo sitúa entre la del adenocarcinoma pancreático ductal y las neoplasias endocrinas (6 meses y 40 meses, respectivamente) (Holen, K.D., y col., J. Clin. Oncol. 20:4673-78 (2002)).

Se sabe poco sobre la patogénesis molecular de los PET (Kloppel, G., y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1014:13-27 (2004)). La inactivación del gen *MEN1* es el acontecimiento génico más frecuente que se identifica en el PET esporádico, mientras que son poco comunes las mutaciones en los genes normalmente implicados en el adenocarcinoma pancreático (Perren, A., y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1014:199-208 (2004)). Se sabe incluso menos con respecto a las anomalías moleculares del PACC (Abraham, S.C., y col., Am. J. Pathol. 160:953-62 (2002)). No está disponible ningún dato del perfil de expresión para el PACC y la comprensión de los cambios de expresión génica que se producen en el PET aún está en una fase inicial (Hansel, D.E., y col., Clin. Cancer Res. 10:6152-58 (2004)).

Los microARN son productos génicos pequeños (20-24 nucleótidos) no codificantes ARN que tienen funciones críticas en muchos procesos biológicos, tales como la proliferación celular, apoptosis y ritmo de desarrollo. Para llevar a cabo estas funciones, los microARN regulan negativamente la estabilidad y/o la eficacia traduccional de sus ARNm dianas (Ambros, V., Nature 431:350-55 (2004)). Actualmente, se conocen 313 microARN maduros de seres humanos, de los cuales 223 se han verificado experimentalmente en seres humanos (www.microna.sanger.ac.uk). Estudios recientes sugieren que la expresión aberrante de ARNm particulares puede estar implicada en enfermedades humanas, tales como trastornos neurológicos (Ishizuka, A., y col., Genes Dev. 16:2497-2508 (2002)) y cáncer. En particular, se ha descubierto una expresión alterada de miR-16-1 y/o miR-15a en las leucemias linfocíticas crónicas (CLL) (Cahn, G.A., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:15524-15529 (2002)). Se ha relacionado la expresión aberrante de 5 microARN con cánceres y se pueden distinguir características diagnósticas/pronósticas de tipos específicos de cáncer basándose en sus perfiles de microARN (Caldas, C., and J.D. Brenton, Nature Med. 11:712-14 (2005); Croce, C.M., y G.A. Calin, Cell 122:6-7 (2005)). Los estudios funcionales también han relacionado la expresión aberrante de microARN con carcinogénesis (Chan, J.A., y col., Cancer Res. 65:6029-33 (2005); Cheng, A.M., y col., 10 Nucleic Acids Res. 33:1290-97 (2005); He, L., y col., Nature

435:828-33 (2005); y Johnson, S.M., y col., Cell 120:635-47 (2005)).

5 El desarrollo y uso de micromatrices que contienen todos los microARN humanos conocidos ha permitido un análisis simultáneo de la expresión de cada miARN en una muestra (Liu, C.G., y col., Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:9740-9744 (2004)). Estas micromatrices de microARN15 no solo se han utilizado para confirmar que el miR-16-1 está mal regulado en las células de CLL humana, sino también para generar firmas de expresión de miARN que se asocian con características clinicopatológicas bien definidas de la CLL humana (Calin, G.A., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:1175-11760 (2004)).

10 El documento WO 2005/078139 se refiere a genes microARN y su asociación con las características cromosómicas implicadas en la etiología de diferentes cánceres. Este documento trata el posible uso de la evaluación de la expresión génica de miR para indicar la presencia de un cáncer que produce una lesión cromosómica en un sujeto.

15 En GUWEIDHI AHMED Y COL: "Enhanced expression of 1-3-3sigma in pancreatic cancer and its role in cell cycle regulation and apoptosis" CARCINOGENESIS (OXFORD), vol. 25, nº 9, Septiembre 2004, páginas 1575-1585, se aborda un estudio dirigido a investigar la expresión y papel funcional del 14-3-3sigma en el adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC). En este estudio se concluyó que la marcada sobre-expresión de 14-3-3sigma en PDAC junto con alteraciones múltiples génicas y epigénicas conocidas de colaboradores potenciales que interactúan con 14-3-3sigma sugieren un papel importante de la señalización 14-3-3sigma corriente abajo en el cáncer pancreático.

20 En LU JUN Y COL: "MicroRNA expression profiles classify human cancers" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 435, nº 7043, 9 de junio de 2005, páginas 834-838, se trata un estudio dirigido al microARN y su uso potencial en el diagnóstico del cáncer.

25 La identificación de microARN que se expresen diferencialmente en las células de cáncer pancreático puede ayudar a localizar miARN específicos que estén implicados en el cáncer pancreático (por ejemplo, tumores pancreáticos endocrinos, carcinomas acinares). Además, la identificación de supuestas dianas de estos miARN puede ayudar a desvelar su papel patogénico. La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer pancreático.

30 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de miARN específicos asociados con niveles de expresión alterados de las células de cáncer pancreático.

35 En consecuencia, la invención proporciona un método para determinar el pronóstico de un sujeto con un cáncer pancreático, que comprende la medición del nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en el que: el producto génico miR se asocia con un pronóstico adverso en el cáncer pancreático; y un aumento en el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativo de un pronóstico adverso en el que el al menos un producto génico miR es el miR-21.
El cáncer pancreático se asocia preferentemente con metástasis y/o un índice alto de proliferación.

45 En consecuencia, la invención proporciona además un método para determinar si un cáncer pancreático en un sujeto es metastático, que comprende la medición del nivel de al menos el producto génico miR-21 en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en el que: el producto génico miR se asocia con metástasis; y un aumento del nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel del producto génico correspondiente en una muestra de control, es indicativo de metástasis.

50 En consecuencia, la invención proporciona además un método para determinar si un cáncer pancreático en un sujeto tiene un índice alto de proliferación, que comprende la medición del nivel de al menos un producto génico miR-21 en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en el que: el producto génico miR se asocia con un índice alto de proliferación; y un aumento del nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra control, es indicativo de un índice alto de proliferación.

55 En consecuencia, la invención proporciona además un método para diagnosticar si un sujeto tiene un cáncer pancreático con un pronóstico adverso, que comprende: (1) la transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo que se obtiene del sujeto para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana; (2) la hibridación de los nucleótidos oligodesoxinucleótidos con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para dicha muestra de ensayo; y (3) la comparación del perfil de hibridación de la muestra de ensayo con una perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control, en el que un aumento de la señal es indicativo de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar un cáncer pancreático con un pronóstico adverso, en el que una alteración de la señal del miR-21 es indicativa de que el sujeto tiene un cáncer pancreático con un pronóstico adverso.

En consecuencia, la invención proporciona además un método para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer pancreático, que comprende la medición del nivel de PDCD4 en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en el que una disminución del nivel de PDCD4 en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de PDCD4 en la muestra de control, es indicativo de un pronóstico adverso.

5 El cáncer pancreático se asocia preferentemente con metástasis y/o un índice alto de proliferación.

En consecuencia, la invención engloba métodos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar un cáncer pancreático. De acuerdo con los métodos de la invención, el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo del sujeto se compara con el nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) del nivel del producto gene 'tico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en la muestra de control, es indicativa de que el sujeto o tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer pancreático.

15 En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del correspondiente producto génico miR en la muestra de control. En otra realización, el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-103-2, miR-107, miR-103-1, miR-342, miR-100, miR-24-2, miR-23a, miR-125a, miR-26a-1, miR-24-1, miR-191, miR-15a, miR-368, miR-26b, miR-125b-2, miR-125b-1, miR-26a-2, miR-335, miR-126, miR-1-2, miR-21, miR-25, 10 miR-92-2, miR-130a, miR-93, miRs-16-1, miR-145, miR-17, miR-99b, miR-181b-1, miR-146, miR-181b-2, miR-16-2, miR-99a, miR-197, miR-10a, miR-224, miR-92-1, miR-27a, 20 miR-221, miR-320, miR-7-1, miR29b-2, miR-150, miR-30d, miR-29a, miR-23b, miR-135a-2, miR-223, miR-3p21-v, miR-128b, miR-30b, miR-29b-1, miR-106b, miR-132, miR-214, miR-7-3, miR-29c, miR-367, miR-30c-2, miR-27b, miR-140, miR- 10b, miR-20, miR-129-1, miR-340, miR-30a, miR-30c-1, miR-106a, miR-32, miR-95, miR-222, miR-30e, miR-129-2, miR-345, miR-143, miR-182, miR-1-1, miR-133a-1, miR-200c, miR-194-1, miR-210, miR-181c, miR-192, miR-220, miR-213, miR-323, miR-375 y una combinación de los mismos. En otra realización más, el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-103, miR-107 y una combinación de los mismos. En otra realización más, el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-23a, miR-26b, miR-192, miR-342 y una combinación de los mismos.

30 En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del correspondiente producto gene 'tico miR en la muestra control. En otra realización, el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-326, miR-155, miR-339, miR-34c, miR-345, miR-152, miR-372, miR-128a y una combinación de los mismos. En otra realización más, el al menos un producto génico miR es el miR-155.

35 En una realización, el al menos un producto génico miR se selecciona del grupo que consiste en miR-103, miR-107, miR-155 y una combinación de los mismos. En otra realización, el al menos un producto génico miR es el miR-103, que está regulado positivamente en la muestra de ensayo, cuando se compara con la muestra control. En otra realización más, el al menos un producto génico miR es miR-107, que está regulado positivamente en la muestra de ensayo, cuando se compara con la muestra control, En otra realización más, el al menos un producto génico miR es 40 miR-155, que está regulado positivamente en la muestra de ensayo, cuando se compara con la muestra de control. En una realización particular, los tres de estos miR (miR-103, miR-107 y miR-155) se comparan con los miR correspondientes de la muestra de control.

45 En la presente divulgación, el cáncer pancreático que se diagnostica es un tumor pancreático endocrino (PET). En otra realización, el cáncer pancreático que se diagnostica es un tumor pancreático exocrino (por ejemplo, un adenocarcinoma). En otra realización más, el cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en un tumor pancreático endocrino (PET) y un tumor pancreático exocrino (por ejemplo, un adenocarcinoma). En una realización particular, el cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en un carcinoma celular acinar (PACC) y un insulinoma. En otra realización, el cáncer 50 pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en un tumor pancreático endocrino (PET), un carcinoma pancreático celular acinar (PACC) y un insulinoma. En otra realización más, el método de diagnóstico se puede utilizar para diagnosticar cualquier tipo de cáncer pancreático.

55 En la presente divulgación, la invención es un método para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un carcinoma celular acinar (PACC). En este método, el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo de un sujeto se compara con el nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) del nivel del producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, PACC. En otra realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra control. En otra realización, el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-103-2, miRs-25, miR-200c, miR-335, miR-21, miR-103-1, miR-92-1, miR-181b-2, miR-191, miR-93, miR-26a-1, miR-17, miR-20, miR-107, miR-26b, miR-215, miR-92-2, miR-192, miR-342, miR-100, miR-3p21-v, miR-106a, miR-15a, miR-23a, miR-181b-1, miR-128b, miR-106b, miR-194-1, miR-219-1, miR-242 y una combinación de los mismos. En otra realización más, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización más, el al 65

menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-218-2, miR-339, miR-326, miR-34c, miR-152, miR-138-2, miR-128a y una combinación de los mismos.

5 Se desvela en el presente documento un método para diagnosticar el tipo de cáncer pancreático que tiene un sujeto. En este método, el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo del sujeto se compara con el nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) en el nivel del producto génico miR de la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico correspondiente en una muestra de control, es indicativa del tipo de cáncer pancreático.

10 En una realización, el tipo de cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en tumor pancreático endocrino (PET) y un carcinoma celular acinar (PACC). En otra realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización, el tipo de cáncer pancreático es un tumor pancreático endocrino (PET) y el al menos un producto génico miR se selecciona e entre el grupo que consiste en miR-125a, miR-99a, miR-99b, miR-125b-1, miR-342, miR-130a, miR-100, miR-132, miR-129-2, miR-125b-2 y una combinación de los mismos. En otra realización más, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización más, el tipo de cáncer pancreático es un carcinoma pancreático acinar celular (PACC) y el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-125a, miR-99a, miR-99b, miR-125b-1, miR-342, miR-130a, miR-100, miR-132, miR-129-2, miR-125b-2 y una combinación de los mismos.

25 En una realización, el tipo de cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en carcinoma endocrino bien diferenciado (WDEC) y carcinoma pancreático acinar celular (PACC). En otra realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en una muestra de control. En otra realización más, el tipo de cáncer pancreático es un carcinoma endocrino bien diferenciado (WEDC) y el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-125a, miR-99a, miR-132 y una combinación de los mismos. En otra realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización más el tipo de cáncer pancreático es un carcinoma endocrino bien diferenciado (WEDC) y el al menos un producto génico miR en el miR-148a.

30 En una realización, el tipo de cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en insulinoma y un tumor pancreático endocrino no funcional (NF-PET). En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización el tipo de cáncer pancreático es un insulinoma y el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-204, miR-203, miR-211 y una combinación de los mismos.

40 Se desvela en el presente documento un método para la determinación del pronóstico de un sujeto con un cáncer pancreático. En este método, se mide el nivel de al menos un producto génico miR, que se asocia con un pronóstico adverso del cáncer pancreático, en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de cáncer pancreático) de un sujeto. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) en el nivel del producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra control, es indicativa de un pronóstico adverso. En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en una muestra de control. En otra realización, el al menos un producto génico miR que se mide es el miR-21. En otra realización más, el cáncer pancreático se asocia con metástasis y/o un índice alto de proliferación.

50 Se desvela en el presente documento un método para determinar si un cáncer pancreático en un sujeto es metastático. En este método, se mide el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de cáncer pancreático) del sujeto. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) del nivel del producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de metástasis. En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en una muestra de control. En otra realización, el al menos un producto génico miR es miR-21.

60 Se desvela en el presente documento un método para determinar si un cáncer pancreático en un sujeto tiene un índice alto de proliferación. En este método, se mide el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo (por ejemplo una muestra de cáncer pancreático) de un sujeto. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) del nivel del producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de un índice alto de proliferación. En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del correspondiente producto génico miR en la muestra de control. En otra realización, el al menos un producto génico miR es el miR-21.

65 Se desvela en el presente documento un método para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer pancreático. En este método, se mide el nivel de PDCD4 en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de cáncer

pancreático) del sujeto. Una alteración (por ejemplo un aumento, una disminución) del nivel de PDCD4 en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de PDCD4 en una muestra control, es indicativa de pronóstico adverso. En una realización, el nivel de PDCD4 de la muestra de control es menor que el nivel de PDCD4 en la muestra de control. En otra realización, el cáncer pancreático se asocia con metástasis y/o índice alto de proliferación.

5 El nivel del al menos un producto génico miR se puede medir utilizando varias técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, análisis de transferencia de Northern, detección por hibridación en solución). En una realización particular, se mide el nivel de al menos un producto génico miR por transcripción inversa de ARN a partir de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana, hibridar los oligodesoxinucleótidos diana a uno o más oligonucleótidos sonda específicos de miARN (por ejemplo, una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN) para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado de una muestra de control. Una alteración de la señal de al menos un miARN en la muestra de ensayo con respecto a la muestra de control es indicativa de que el sujeto o tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer pancreático. En una realización, la señal de al menos un miARN está regulada positivamente, con respecto a la señal generada por la muestra de control. En otra realización, la señal de al menos un miARN está regulada negativamente, con respecto a la señal generada por la muestra de control. En una realización particular, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN de una parte sustancial de todos los miARN humanos conocidos. En una realización más, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN de uno o más miARN seleccionados de entre el grupo que consiste en miR-103-2, miR-107, miR-103-1, miR-342, miR-100, miR-24-2, miR-23a, miR-125a, miR-26a-1, miR-24-1, miR-191, miR-15a, miR-368, miR-26b, miR-125b-2, miR-125b-1, miR-26a-2, miR-335, miR-126, miR-1-2, miR-21, miR-25, miR-92-2, miR-130a, miR-93, miR-16-1, miR-145, miR-17, miR-99b, miR-181b-1, miR-146, miR-181b-2, miR-16-2, miR-99a, miR-197, miR-10a, miR-224, miR-92-1, miR-27a, miR-221, miR-320, miR-7-1, miR-29b-2, miR-150, miR-30d, miR-29a, miR-23b, miR-135a-2, miR-223, miR-3p21-v, miR-128b, miR-30b, miR-29b-1, miR-106b, miR-132, miR-214, miR-7-3, miR-29c, miR-367, miR-30c-2, miR-27b, miR-140, miR-10b, miR-20, miR-129-1, miR-340, miR-30a, miR-30c-1, miR-106a, miR-32, miR-95, miR-222, miR-30e, miR-129-2, miR-345, miR-143, miR-182, miR-1-1, miR-133a-1, miR-200c, miR-194-1, miR-210, miR-181c, miR-192, miR-220, miR-213, miR-323, miR-375, miR-326, miR-155, miR-339, miR-34c, miR-345, miR-152, miR-372, miR-128a y una combinación de los mismos.

30 Se desvela en el presente documento métodos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar un cáncer pancreático con un pronóstico adverso. En este método, se mide el nivel de al menos un producto génico miR, que se asocia con un pronóstico adverso en el cáncer pancreático, por transcripción inversa de ARN a partir de la muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana. Los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan entonces con uno o más oligonucleótidos sonda específicos de miARN (por ejemplo, una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda miR) para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y el perfil de hibridación de la muestra de ensayo se compara con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control. Una alteración en la señal de al menos un miARN en la muestra de ensayo con respecto a la muestra de control es indicativa de que el sujeto o tiene, o está en riesgo de desarrollar un cáncer pancreático con un pronóstico adverso. En una realización, una alteración en la señal de miR-21 es indicativa de que el sujeto o tiene, o está en riesgo de desarrollar un cáncer pancreático con un pronóstico adverso.

45 La divulgación incluye métodos para tratar un cáncer pancreático en un sujeto, en el que al menos un producto génico miR está mal regulado (por ejemplo, regulado positivamente, regulado negativamente) en las células cancerosas de un sujeto. Cuando al menos un producto génico miR aislado está regulado negativamente en las células del cáncer pancreático, el método comprende la administración de una cantidad eficaz de un producto génico miR aislado, o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo, tal que se inhiba la proliferación de las células cancerosas en el sujeto. En una realización, el al menos un producto génico miR aislado que se administra al sujeto se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-326, miR-155, miR-339, miR-34c, miR-345, miR-152, miR-372, miR-128a y una combinación de los mismos (o una variante aislada o fragmento biológicamente activo de uno o más de estos miR). Cuando al menos un producto génico miR aislado está regulado positivamente en las células cancerosas, el método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico miR, tal que se inhiba la proliferación de las células del cáncer pancreático. En una realización, el compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico miR inhibe un producto génico miR seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-103-2, miR-107, miR-103-1, miR-342, miR-100, miR-24-2, miR-23a, miR-125a, miR-26a-1, miR-24-1, miR-191, miR-15a, miR-368, miR-26b, miR-125b-2, miR-125b-1, miR-26a-2, miR-335, miR-126, miR-1-2, miR-21, miR-25, miR-92-2, miR-130a, miR-93, miR-16-1, miR-145, miR-17, miR-99b, miR-181b-1, miR-146, miR-181b-2, miR-16-2, miR-99a, miR-197, miR-10a, miR-224, miR-92-1, miR-27a, miR-221, miR-320, miR-7-1, miR-29b-2, miR-150, miR-30d, miR-29a, miR-23b, miR-135a-2, miR-223, miR-3p21-v, miR-128b, miR-30b, miR-29b-1, miR-106b, miR-132, miR-214, miR-7-3, miR-29c, miR-367, miR-30c-2, miR-27b, miR-140, miR-10b, miR-20, miR-129-1, miR-340, miR-30a, miR-30c-1, miR-106a, miR-32, miR-95, miR-222, miR-30e, miR-129-2, miR-345, miR-143, miR-182, miR-1-1, miR-133a-1, miR-200c, miR-194-1, miR-210, miR-181c, miR-192, miR-220, miR-213, miR-323, miR-375 y una combinación de los mismos. En una realización relacionada, los métodos para tratar el cáncer pancreático en un sujeto comprenden adicionalmente la etapa de determinar primero la cantidad de al menos un producto génico miR en las células de un cáncer pancreático de un sujeto, y comparando el nivel del producto génico miR con el nivel de un producto génico

miR correspondiente en las células de control. Si la expresión del producto génico miR está mal regulado (por ejemplo, regulado negativamente, regulado positivamente) en las células del cáncer pancreático, los métodos comprenden además la alteración de la cantidad del al menos un producto génico miR que se expresa en las células del cáncer pancreático. En una realización, la cantidad del producto génico miR que se expresa en las células del cáncer pancreático es menor que la cantidad del producto génico miR que se expresa en las células de control, y se administra una cantidad eficaz del producto génico miR, o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo, al sujeto. En otra realización, la cantidad del producto génico miR que se expresa en las células cancerosas es mayor que la cantidad del producto génico miR que se expresa en las células de control, y se administra una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un gen miR al sujeto. Los miR y compuestos adecuados que inhiben la expresión de los genes miR incluyen, por ejemplo, los que se describen en el presente documento.

Se desvelan en el presente documento composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer pancreático. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico miR aislado, o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el al menos un producto génico miR corresponde a un producto génico miR que tiene una disminución del nivel de expresión en las células del cáncer pancreático con respecto a las células de control adecuadas (es decir, está regulado negativamente). En cierta realización, el producto génico miR aislado se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-326, miR-155, miR-339, miR-34c, miR-345, miR-152, miR-372, miR-128a y una combinación de los mismos.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR es específico para un producto génico miR cuya expresión es mayor en las células del cáncer pancreático que en las células de control (es decir, está regulado positivamente). En ciertas realizaciones, el compuesto de inhibición de la expresión es específico de uno o más productos génicos miR seleccionados de entre el grupo que consiste en miR-103-2, miR-107, miR-103-1, miR-342, miR-100, miR-24-2, miR-23a, miR-125a, miR-26a-1, miR-24-1, miR-191, miR-15a, miR-368, miR-26b, miR-125b-2, miR-125b-1, miR-26a-2, miR-335, miR-126, miR-1-2, miR-21, miR-25, miR-92-2, miR-130a, miR-93, miR-16-1, miR-145, miR-17, miR-99b, miR-181b-1, miR-146, miR-181b-2, miR-16-2, miR-99a, miR-197, miR-10a, miR-224, miR-92-1, miR-27a, miR-221, miR-320, miR-7-1, miR-29b-2, miR-150, miR-30d, miR-29a, miR-23b, miR-135a-2, miR-223, miR-3p21-v, miR-128b, miR-30b, miR-29b-1, miR-106b, miR-132, miR-214, miR-7-3, miR-29c, miR-367, miR-30c-2, miR-27b, miR-140, miR-10b, miR-20, miR-129-1, miR-340, miR-30a, miR-30c-1, miR-106a, miR-32, miRs-95, miR-222, miR-30e, miR-129-2, miR-345, miR-143, miR-182, miR-1-1, miR-133a-1, miR-200c, miR-194-1, miR-210, miR-181c, miR-192, miR-220, miR-213, miR-323, miR-375 y una combinación de los mismos.

Se desvelan en el presente documento métodos para identificar un agente anti-cáncer pancreático, que comprenden proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR en la célula. En una realización, el método comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR asociado con niveles de expresión disminuidos en las células del cáncer pancreático. Un aumento del nivel del producto génico miR en la célula, respecto a una célula de control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti-cáncer pancreático. En una realización particular, el al menos un producto génico miR asociado con niveles de expresión disminuidos en las células del cáncer pancreático se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-326, miR-155, miR-339, miR-34c, miR-345, miR-152, miR-372, miR-128a y una combinación de los mismos.

En otras realizaciones, el método comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR asociado con el aumento de los niveles de expresión en las células del cáncer pancreático. Una disminución en el nivel del producto génico miR asociado con el aumento de los niveles de expresión en las células del cáncer pancreático, con respecto a una célula de control adecuada, es indicativa de que el agente de ensayo es un agente anti-cáncer pancreático. En una realización particular, el al menos un producto génico miR asociado con el aumento de los niveles de expresión en células del cáncer pancreático se seleccionan de entre el grupo que consiste en miR-103-2, miR-107, miR-103-1, miR-342, miR-100, miR-24-2, miR-23a, miR-125a, miR-26a-1, miR-24-1, miR-191, miR-15a, miR-368, miR-26b, miR-125b-2, miR-125b-1, miR-26a-2, miR-335, miR-126, miR-1-2, miR-21, miR-25, miR-92-2, miR-130a, miR-93, miR-16-1, miR-145, miR-17, miR-99b, miR-181b-1, miR-146, miR-181b-2, miR-16-2, miR-99a, miR-197, miR-10a, miR-224, miR-92-1, miR-27a, miR-221, miR-320, miR-7-1, miR-29b-2, miR-150, miR-30d, miR-29a, miR-23b, miR-135a-2, miR-223, miR-3p21-v, miR-128b, miR-30b, miR-29b-1, miR-106b, miR-132, miR-214, miR-7-3, miR-29c, miR-367, miR-30c-2, miR-27b, miR-140, miR-10b, miR-20, miR-129-1, miR-340, miR-30a, miR-30c-1, miR-106a, miR-32, miR-95, miR-222, miR-30e, miR-129-2, miR-345, miR-143, miR-182, miR-1-1, miR-133a-1, miR-200c, miR-194-1, miR-210, miR-181c, miR-192, miR-220, miR-213, miR-323, miR-375 y una combinación de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La patente o solicitud presentada contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta patente o solicitud de patente con dibujos en color se proporcionará por la oficina bajo pedido y pago de la tasa necesaria.

5 La FIG. 1A representa una vista del grupo jerárquico no supervisado de expresión de miARN de 13 páncreas normales (Normal) y 44 tumores pancreáticos, incluyendo 22 tumores pancreáticos endocrinos bien diferenciados (WDET), 18 carcinomas pancreáticos endocrinos bien diferenciados (WDEC) y 4 carcinomas pancreáticos celulares acinares (ACC) (enumerados en la parte superior). Las muestras WDET incluían 11 insulinosomas (INS) y 1 PET no funcional (NF); las muestras de WDEC incluían 1 INS y 17 NF-PET. El análisis se llevó a cabo utilizando los valores agregados de manchas replicadas obtenidas aplicando el algoritmo de suavización de medianas y seleccionando las primeras 200 sondas del intervalo intercuartil más alto, que contenía las secuencias de microARN maduro. Particularmente, las muestras de PACC se encuadraban en un grupo único que era parte de un grupo mayor que incluía todos los PET, mientras que no había un patrón distintivo entre insulinosomas y NF-PET. Como se representa, un patrón de expresión de microARN común distingue los tumores pancreáticos endocrino y acinar de los páncreas normales.

10 La FIG. 1B representa los microARN particulares que se encuentran regulados positivamente en PET frente a los tejidos normales (los microARN regulados positivamente se enumeran en rojo).

15 La FIG. 1C representa los microARN particulares que se encuentran regulados positivamente en PET frente a los tejidos normales (los microARN regulados positivamente se enumeran en rojo).

20 La FIG. 1D representa dos microARN que están regulados positivamente en el insulinoma frente a los PET no funcionales (los microARN regulados positivamente se enumeran en azul).

25 La FIG. 1E representa microARN particulares que se encuentran regulados negativamente en PET frente a los tejidos normales (los microARN se enumeran en verde).

30 La FIG. 2A representa gráficos de caja y bigotes que muestran los niveles de expresión de *miR-103* y *miR-155*, que se midieron por análisis de micromatriz de 12 páncreas normales (Normal) y 44 tumores pancreáticos, incluyendo 22 tumores pancreáticos endocrinos bien diferenciados (WEDT), 18 carcinomas pancreáticos endocrinos bien diferenciados (WEDC) y 4 carcinomas pancreáticos celulares acinares (ACC). La intensidad media está resaltada por líneas en negrita. Como se muestra, la sobre-expresión de *miR-103* y la falta de expresión de *miR-155* es particular de los tumores pancreáticos insular y acinar.

35 La FIG. 2B representa los análisis de transferencia de Northern, en paralelo con los datos de expresión de la micromatriz que se muestran en la FIG. 2A. El ARNr 5S (ARN-5S) sirvió como control de carga.

40 La FIG. 3A representa un gráfico de caja y bigotes que muestra el nivel de expresión del *miR-204*, que se midió por análisis de micromatriz de 13 páncreas normales (Normal), 12 insulinosomas, 28 tumores pancreáticos endocrinos no funcionales (NF-PET) y 4 carcinomas pancreáticos celulares acinares (ACC). La intensidad media se resalta con líneas en negrita.

45 La FIG. 3B es un gráfico que muestra una fuerte correlación entre la expresión de *miR-204* y la insulina teñida evaluada por inmunohistoquímica (IHC).

50 La FIG. 3C representa los análisis de transferencia de Northern, que confirman los datos de la expresión de la micromatriz y muestra que la sobre-expresión del *miR-204* es específica de insulinosomas. El ARNr 5S (ARN-5S) sirvió como control de carga.

55 La FIG. 4A representa un gráfico de caja y bigotes que muestra el nivel de expresión diferencial de *miR-21*, que se midió por análisis de micromatriz, entre tumores pancreáticos endocrinos con (Meta+) o sin (Meta-) metástasis hepática. Como se muestra, la expresión de *miR-21* se asocia fuertemente con metástasis hepática.

60 La FIG. 4B representa un gráfico de caja y bigotes que muestra el nivel de expresión diferencial de *miR-21*, que se midió por análisis de micromatriz, entre tumores con un índice de proliferación > 2 % (Alto) o ≤ 2 % (Bajo), medido por inmunohistoquímica Ki67. Como se muestra, la expresión de *miR-21* se asocia fuertemente con el índice de proliferación tumoral.

65 La FIG. 4C representa los análisis de transferencia de Northern, que confirma los datos de la expresión de la micromatriz. El ARNr 5S (ARN-5S) sirvió como control de carga.

La FIG. 5 es un gráfico que muestra la expresión de *miR-21* y ARNm PDCD4 en páncreas normal (*), PET metastático (▲) y no metastático (Δ). Se utilizó una función pesada localmente robusta para ajustar una línea entre los puntos de datos. Como se muestra, hay una correlación inversa entre la expresión de *miR-21* y su supuesta diana ARNm PDCD4.

La FIG. 6A representa los análisis de transferencia de Northern que muestran la sobre-expresión de *miR-26b* y *miR-107* en todos los insulinosomas pancreáticos y tumores endocrinos no funcionales (NF-PET) que fueron ensayados. Estos resultados validan los datos de la micromatriz para los microARN sobre-expresados. El ARNr 5S (ARN-5S) sirvió como control de carga.

La FIG. 6B representa los análisis de transferencia de Northern que muestran la sobre-expresión de *miR-23a* and *miR-342* en todos los insulinosomas pancreáticos y tumores endocrinos no funcionales (NF-PET) que fueron ensayados. Estos resultados validan los datos de la micromatriz para los microARN sobre-expresados. El ARNr 5S (ARN-5S) sirvió como control de carga.

La FIG. 6C representa el análisis de transferencia de Northern que muestra la sobre-expresión de *miR-192* en cuatro de ocho tumores endocrinos bien diferenciados (WDET), en los cuatro carcinomas endocrinos bien diferenciados (WDEC), y un carcinoma celular acinar (ACC). Estos resultados validan los datos de la micromatriz para el microARN sobre-expresado. El ARNr 5S (ARN-5S) sirvió como control de carga.

La FIG. 7 A representa el análisis de transferencia de Northern que muestra que el *miR-375* es un miR específico de páncreas. El ARNr 5S (ARN-5S) sirvió como control de carga.

La FIG. 7B representa el análisis de transferencia de Northern que muestra que la expresión de *miR-375* es característica de tumores pancreáticos endocrinos y acinares, independientemente de la presencia (insulinomas) o ausencia (NF-PET) de sobre-secreción clínicamente evidente de insulina. NF-PET, tumores pancreáticos endocrinos no funcionales. El ARNr 5S (ARN-5S) sirvió como control de carga. Como se muestra, la expresión de *miR-375* es común en tumores pancreáticos insular y acinar.

La FIG. 7C representa el análisis de transferencia de Northern que muestra que la expresión de *miR-375* es característica de tumores pancreáticos endocrinos y acinares, independientemente de la presencia (insulinomas) o ausencia (NF-PET y ACC) de sobre-secreción clínicamente evidente de insulina, NF-PET, tumores pancreáticos endocrinos no funcionales; ACC, carcinomas pancreáticos celulares acinares. El ARNr 5S (ARN-5S) sirvió como control de carga. Como se muestra, la expresión de *miR-375* es común en tumores pancreáticos insular y acinar.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de microARN particulares que tienen una alteración en la expresión en las células del cáncer pancreático con respecto a células normales de control, y en la asociación de estos microARN con el diagnóstico, pronóstico y características terapéuticas particulares. Como se describe en el presente documento:

- i) un patrón común de expresión de microARN distingue tipos de tumor pancreático del páncreas normal, y de esta manera implica la participación de microARN particulares en la tumorigénesis pancreática;
- ii) la expresión de *miR-103* y *miR-107*, asociada con la falta de expresión de *miR-155*, discrimina entre tumores pancreáticos y páncreas normales;
- iii) al menos 10 microARN distinguen tumores endocrinos de tumores acinares, e implican microARN particulares en la diferenciación endocrina y/o tumorigénesis endocrina;
- iv) el *miR-204* se expresa primariamente en insulinomas y se correlaciona con la expresión inmunohistoquímica de insulina; y
- v) la sobre-expresión de *miR-21* se asocia fuertemente con un índice alto Ki67 de proliferación y la presencia de metástasis hepática.

Estos resultados implican que la alteración en la expresión de microARN se relaciona con la transformación neoplásica endocrina y acinar y la progresión de la enfermedad maligna. En consecuencia, la expresión de microARN particulares, así como las alteraciones de la expresión de tales microARN, se pueden utilizar en el diagnóstico, pronóstico y métodos terapéuticos descritos en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento de manera intercambiable, un "producto génico miR", "microARN", "miR" o "miARN" se refiere a una transcripción ARN no procesada o procesada a partir de un gen miR. Como los productos génicos miR no se traducen en proteínas, la expresión "productos génicos miR" no incluye proteínas. Las transcripciones génicas miR no procesadas también se llaman "precursores miR", y comprenden normalmente una transcripción ARN de aproximadamente 70-100 nucleótidos de longitud. El precursor miR se puede procesar por digestión con una RNasa (por ejemplo, Dicer, Argonauta, RNasa III) en una molécula ARN de 19-25 nucleótidos. Esta molécula activa de ARN de 19-25 nucleótidos también se llama la transcripción génica miR "procesada" o miARN "maduro".

La molécula activa de ARN de 19-25 nucleótidos se puede obtener a partir del precursor miR por medio de vías naturales de procesamiento (por ejemplo utilizando células intactas o lisados celulares) o por vías de procesamiento sintéticas (por ejemplo, utilizando enzimas de procesamiento aisladas, tales como Dicer, Argonauta, o RNasa III). Se entiende que la molécula activa de ARN de 19-25 nucleótidos también se puede producir directamente por síntesis biológica o química, sin que tengan que procesarse a partir del precursor miR. Cuando un microARN se denomina en el presente documento por el nombre, el nombre corresponderá tanto al precursor y a las formas maduras, a menos de que se indique otra cosa.

La presente divulgación engloba métodos para diagnosticar si el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar un cáncer pancreático, que comprende la medición del nivel de al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo de un sujeto y compara el nivel del producto génico miR en la muestra de ensayo con el nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control. Como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" puede ser cualquier mamífero que tenga, o sea sospechoso de tener, un cáncer pancreático. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano que tiene, o es sospechoso de tener un cáncer pancreático.

El cáncer pancreático puede ser cualquier forma de cáncer pancreático, por ejemplo cánceres pancreáticos de diferentes histologías (por ejemplo, tumores exocrinos, tumores endocrinos, carcinomas, linfomas). En otra realización el cáncer pancreático que se diagnostica es un tumor endocrino (PET). En otra realización, el cáncer pancreático que se diagnostica es un tumor pancreático exocrino (por ejemplo, un adenocarcinoma). En otra realización más, el cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en tumor

pancreático endocrino (PET) y un tumor pancreático exocrino (por ejemplo, un adenocarcinoma). En una realización en particular, el cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en un carcinoma celular acinar (PACC) y un insulinoma. En otra realización más, el cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en un tumor pancreático endocrino (PET), un carcinoma celular acinar (PACC) y un insulinoma. Además, como se describe en el presente documento, el cáncer pancreático se puede asociar con un pronóstico particular (por ejemplo, baja tasa de supervivencia, progresión rápida).

Las Tablas 1a y 1b representan las secuencias de nucleótidos de microARN precursores y maduros humanos particulares.

Tabla 1a – Secuencias precursoras de microARN humano

Nombre del precursor	Secuencia (5' a 3')*	SEC ID N°
<i>let-7a-1</i>	<u>CACUGUGGGAUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU</u> UUAGGGUCACACCCACCACUGGGAGAUAAUA UACAAUCUACUGUCUUCCUAACGUG	1
<i>let-7a-2</i>	<u>AGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUAGAA</u> UUACAUCAAGGGAGAUACUGUACAGCCUCCU AGCUUCCU	2
<i>let-7a-3</i>	<u>GGGUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGGGGCU</u> CUGCCCUGCUAUGGGAUAAUAUACAAUCUAC UGUCUUCCU	3
<i>let-7a-4</i>	<u>GUGACUGCAUGCUCUCCAGGUUGAGGUAGUAGG</u> <u>UUGUAUAGUUAGAAUACACAAGGGAGAUAA</u> CUGUACAGCCUCCUAGCUUCCUUGGGUCUUG CACUAAACAAC	4
<i>let-7b</i>	<u>GGCGGGGUGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUUUA</u> GGGCAGUGAUGUUGCCCCUCGGAAGAUAAUA UACAACCUACUGCCUCCUCCUG	5
<i>let-7c</i>	<u>GCAUCCGGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU</u> UAGAGUUACACCCUGGGAGUUAACUGUACAAC CUUCUAGCUUCCUUGGAGC	6
<i>let-7d</i>	<u>CCUAGGAAGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUUUA</u> GGGCAGGGAUUUUGCCCACAAGGAGGUAACUA UACGACCUGCUGCCUUCUAGG	7
<i>let-7d-v1</i>	<u>CUAGGAAGAGGUAGUAGUUUGCAUAGUUUAG</u> GGCAAAGAUUUUGCCCACAAGUAGUAGCUAU ACGACCUGCAGCCUUUUGUAG	8
<i>let-7d-v2</i>	<u>CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCG</u> GGUUGUGACAUUGCCCGCUGUGGAGAUAAUCG CGCAAGCUACUGCCUUGCUAG	9
<i>let-7e</i>	<u>CCCGGGCUGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUUGAG</u> GAGGACACCCAAGGAGAUACUAUACGGCCUC CUAGCUUCCCCAGG	10
<i>let-7f-1</i>	<u>UCAGAGUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGUGG</u> GGUAGUGAUUUUACCCUGUUCAGGAGAUAAU AUACAUCUAUUGCCUCCUGA	11
<i>let-7f-2-1</i>	<u>CUGUGGGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGU</u> GGGGUAGUGAUUUUACCCUGUUCAGGAGAUAA CUAUACAUCUAUUGCCUCCUGA	12
<i>let-7f-2-2</i>	<u>CUGUGGGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUUU</u> AGGGUCAUACCCAUCUUGGAGAUAAUAUAC AGUCUACUGUCUUUCCACGG	13
<i>let-7g</i>	<u>UUGCCUGAUUCCAGGCUGAGGUAGUAGUUUGU</u> <u>ACAGUUUGAGGGUCUAUGAUACCACCCGGUAC</u> AGGAGAUAAUCUGUACAGGCCACUGCCUUGCCA GGAACAGCGCGC	14

<i>let-71</i>	<u>CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCG</u> <u>GGUUGUGACAUUGCCCCGUGGGAGAUAACUG</u> <u>CGCAAGCUACUGCCUUGCUAG</u>	15
<i>miR-1b-1-1</i>	<u>ACCUACUCAGAGUACAUAUCUUCUUUAUGUACC</u> <u>CAUAUGAACAUACAAUGCUAUGGAAUGUAAAG</u> <u>AAGUAUGUAUUUUUGGUAGGC</u>	16
<i>miR-1b-1-2</i>	<u>CAGCUAACAAACUAGUAAUACCUACUCAGAGU</u> <u>ACAUAUCUUCUUUAUGUACCCAUUGAACAUAC</u> <u>AAUGCUAUGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAUUUU</u> <u>UGGUAGGCAUA</u>	17
<i>miR-1b-2</i>	<u>GCCUGCUUGGGAAACAUAUCUUCUUUAUAUGCC</u> <u>CAUAUGGACCUGCUAAGCUAUGGAAUGUAAAG</u> <u>AAGUAUGUAUCUCAGGCCGGG</u>	18
<i>miR-1b</i>	<u>UGGGAAACAUAUCUUCUUUAUAUGCCCAUAUGG</u> <u>ACCUGCUAAGCUAUGGAAUGUAAAGAAGUAUG</u> <u>UAUCUCA</u>	19
<i>miR-1d</i>	<u>ACCUACUCAGAGUACAUAUCUUCUUUAUGUACC</u> <u>CAUAUGAACAUACAAUGCUAUGGAAUGUAAAG</u> <u>AAGUAUGUAUUUUUGGUAGGC</u>	20
<i>miR-7-1a</i>	<u>UGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUA</u> <u>GUGAUUUUGUUGUUUUUAGAUAAACUAAAUCGA</u> <u>CAACAAUUCACAGUCUGCCAUAUGGCACAGGC</u> <u>CAUGCCUCUACA</u>	21
<i>miR-7-1b</i>	<u>UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACU</u> <u>AGUGAUUUUGUUGUUUUUAGAUAAACUAAAUCG</u> <u>ACAACAAUUCACAGUCUGCCAUAUGGCACAGG</u> <u>CCAUGCCUCUACAG</u>	22
<i>miR-7-2</i>	<u>CUGGAUACAGAGUGGACCGGCUGGCCCCAUCU</u> <u>GGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUGUCUACUG</u> <u>CGCUCAACAACAAAUCCAGUCUACCUA AUGG</u> <u>UGCCAGCCAUCGCA</u>	23
<i>miR-7-3</i>	<u>AGAUUAGAGUGGCUGUGGUCUAGUGCUGUGUG</u> <u>GAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUCUGAUGUACU</u> <u>ACGACAACAAGUCACAGCCGGCCUCAUAGCGC</u> <u>AGACUCCCUUCGAC</u>	24
<i>miR-9-1</i>	<u>CGGGGUUGGUUGUUAUCUUGGUUAUCUAGCU</u> <u>GUAUGAGUGGUGUGGAGUCUUCAUAAAGCUAG</u> <u>AUAACCGAAAGUAAAAUAACCCCA</u>	25
<i>miR-9-2</i>	<u>GGAAGCGAGUUGUUAUCUUGGUUAUCUAGCU</u> <u>GUAUGAGUGUAUUGGUCUUCAUAAAGCUAGAU</u> <u>AACCGAAAGUAAAAACUCCUCA</u>	26
<i>miR-9-3</i>	<u>GGAGGCCCGUUUCUCUCUUUGGUUAUCUAGCU</u> <u>GUAUGAGUGCCACAGAGCCGUCAUAAAGCUAG</u> <u>AUAACCGAAAGUAGAAAUGAUUCUCA</u>	27
<i>miR-10a</i>	<u>GAUCUGUCUGUCUUCUGUAUAUACCCUGUAGA</u> <u>UCCGAAUUUGUGUAAGGAAUUUUGUGGUCACA</u> <u>AAUUCGUAUCUAGGGGAAUAUGUAGUUGACAU</u> <u>AAACACUCCGCUCU</u>	28
<i>miR-10b</i>	<u>CCAGAGGUUGUAACGUUGUCUAUAUAUACCCU</u> <u>GUAGAACCGAAUUUGUGUGGUAUCCGUUAUAGU</u> <u>CACAGAUUCGAUUCUAGGGGAAUAUAUGGUCG</u> <u>AUGCAAAAACUUCA</u>	29

<i>miR-15a-2</i>	<u>GCGCGAAUGUGUGUUUAAAAAAAAUAAAACCU</u> <u>UGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG</u> <u>GAUUUUGAAAAGGUGCAGGCCAUAUUGUGCUG</u> <u>CCUCAAAAUAAC</u>	30
<i>miR-15pa</i>	<u>CCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUU</u> <u>GUGGAUUUGAAAAGGUGCAGGCCAUAUUGUG</u> <u>CUGCCUCAAAAUAACAAGG</u>	31
<i>miR-15b-1</i>	<u>CUGUAGCAGCACAUCAUGGUUUACAUGCAC</u> <u>GUCAAGAUGCGAAUCAUUUUUGCUGCUCUAG</u> <u>UUGAGGCCUUAAAGUACUGUAGCAGCACAUCA</u> <u>UGGUUUACAUGCUCACAGUCAAGAUGCGAAUCA</u> <u>UUUUUGCUGCUCUAGAAUUUAAGGAAAUUC</u> <u>AU</u>	32
<i>miR-15b-2</i>	<u>UUGAGGCCUUAAAGUACUGUAGCAGCACAUCA</u> <u>UGGUUUACAUGCUCACAGUCAAGAUGCGAAUCA</u> <u>UUUUUGCUGCUCUAGAAUUUAAGGAAAUUC</u> <u>AU</u>	33
<i>miR-16-1</i>	<u>GUCAGCAGUGCCUUAGCAGCACGUAAAUAUUG</u> <u>GCGUUAAAGAUUCUAAAUAUUCUCCAGUAUA</u> <u>ACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGAC</u>	34
<i>miR-16-2</i>	<u>GUUCCACUCUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGU</u> <u>AGUGAAAUUAUUAUUAACACCAAUAUACUG</u> <u>UGCUGCUUUAGUGUGAC</u>	35
<i>miR-16-13</i>	<u>GCAGUGCCUUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGU</u> <u>UAAGAUCUAAAUAUUCUCCAGUAUUAACUG</u> <u>UGCUGCUGAAGUAAGGU</u>	36
<i>miR-17</i>	<u>GUCAGAAUAAUGUCAAAAGUGCUUACAGUGCAG</u> <u>GUAGUGAU AUGUGCAUCUACUGCAGUGAAGGC</u> <u>ACUUGUAGCAUUAUGGUGAC</u>	37
<i>miR-18</i>	<u>UGUUCUAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAGUGAA</u> <u>GUAGAUUAGCAUCUACUGCCCUAAGUGCUCU</u> <u>UCUGGCA</u>	38
<i>miR-18-13</i>	<u>UUUUUGUUCUAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG</u> <u>UGAAGUAGAUUAGCAUCUACUGCCCUAAGUGC</u> <u>UCCUUCUGGCAUAAGAA</u>	39
<i>miR-19a</i>	<u>GCAGUCCUCUGUUAGUUUUGCAUAGUUGCACU</u> <u>ACAAGAAGAAUGUAGUUGUGCAAUCUAUGCA</u> <u>AAACUGAUGGUGGCCUGC</u>	40
<i>miR-19a-13</i>	<u>CAGUCCUCUGUUAGUUUUGCAUAGUUGCACUA</u> <u>CAAGAAGAAUGUAGUUGUGCAAUCUAUGCAA</u> <u>AAACUGAUGGUGGCCUG</u>	41
<i>miR-19b-1</i>	<u>CACUGUUCUAUGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCA</u> <u>UCCAGCUGUGUGAUUAUUCUGCUGUGCAAUCC</u> <u>AUGCAAACUGACUGUGGUAGUG</u>	42
<i>miR-19b-2</i>	<u>ACAUUGCUCACUACAUAUAGUUUUGCAGGUUU</u> <u>GCAUUCAGCGUAUAUAUGUAUAUGUGGCUGU</u> <u>GCAAUCCAUGCAAACUGAUUGUGAUAAUGU</u> <u>UUCUAUGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAG</u> <u>CUGUGUGAUUAUUCUGCUGUGCAAUCCAUGCA</u> <u>AAACUGACUGUGGUAG</u>	43
<i>miR-19b-13</i>	<u>UUCUAUGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAG</u> <u>CUGUGUGAUUAUUCUGCUGUGCAAUCCAUGCA</u> <u>AAACUGACUGUGGUAG</u>	44
<i>miR-19b-X</i>	<u>UUACAAUUAAGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCAGC</u> <u>GUAUAUAUGUAUAUGUGGCUGUGCAAUCCA</u> <u>GCAAACUGAUUGUGAU</u>	45
<i>miR-20 (miR-20a)</i>	<u>GUAGCACUAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAGUG</u> <u>UUUAGUUAUCUACUGCAUUAUGAGCACUUAAA</u> <u>GUACUGC</u>	46

miR-21	<u>UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUG</u> <u>UUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCU</u> <u>GUCUGACA</u>	47
miR-21-17	<u>ACCUUGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUG</u> <u>ACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUG</u> <u>GGCUGUCUGACAUUUUG</u>	48
miR-22	<u>GGCUGAGCCGCAGUAGUUCUUCAGUGGCAAGC</u> <u>UUUAUGUCCUGACCCAGCUAAAGCUGCCAGUU</u> <u>GAAGAACUGUUGCCCUCUGCC</u>	49
miR-23a	<u>GGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUGGGAUUUGC</u> <u>UUCCUGUCACAAAUACAUUGCCAGGGAUUUC</u> <u>CAACCGACC</u>	50
miR-23b	<u>CUCAGGUGCUCUGGCUGCUUGGGUUCUGGCA</u> <u>UGCUGAUUUGUGACUUAAGAUUAAAUCACAU</u> <u>UGCCAGGGAUUACCACGCAACCACGACCUUGG</u> <u>C</u>	51
miR-23-19	<u>CCACGGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUGGGAU</u> <u>UUGCUIUCCUGUCACAAAUACAUUGCCAGGGA</u> <u>UUUCCAACCGACCCUGA</u>	52
miR-24-1	<u>CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUUCAGUUCUC</u> <u>AUUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACA</u> <u>GGAG</u>	53
miR-24-2	<u>CUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAAACAC</u> <u>AGUUGGUUUGUGUACACUGGCUCAGUUCAGCA</u> <u>GGAACAGGG</u>	54
miR-24-19	<u>CCCUGGGCUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUG</u> <u>AAACACAGUUGGUUUGUGUACACUGGCUCAGU</u> <u>UCAGCAGGAACAGGGG</u>	55
miR-24-9	<u>CCCUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUUCAGUUC</u> <u>UCAUUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAA</u> <u>CAGCAUC</u>	56
miR-25	<u>GGCCAGUGUUGAGAGGGCGGAGACUUGGGCAAU</u> <u>UGCUGGACGCUGCCCUGGGCAUUGCACUUGUC</u> <u>UCGGUCUGACAGUGCCGGCC</u>	57
miR-26a	<u>AGGCCGUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUA</u> <u>GGCUGUGCAGGUCCCAAUGGCCUAUCUUGGUU</u> <u>ACUUGCACGGGGACGCGGGCCU</u>	58
miR-26a-1	<u>GUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCUG</u> <u>UGCAGGUCCCAAUGGGCCUAUUCUUGGUUACU</u> <u>UGCACGGGGACGC</u>	59
miR-26a-2	<u>GGCUGUGGCUGGAUUCAAGUAAUCCAGGAUAG</u> <u>GCUGUUUCCAUCUGUGAGGCCUAUUCUUGAUU</u> <u>ACUUGUUUCUGGAGGCAGCU</u>	60
miR-26b	<u>CCGGGACCCAGUUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU</u> <u>UGUGUGCUGUCCAGCCUGUUCUCCAUAUACUUG</u> <u>GCUCGGGGACCGG</u>	61
miR-27a	<u>CUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCAG</u> <u>GGUCCACACCAAGUCGUGUUCACAGUGGCUAA</u> <u>GUUCCGCCCCCCAG</u>	62
miR-27b-1	<u>AGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUUGGUGAACAGUG</u> <u>AUUGGUUUCCGCUUUGUUCACAGUGGCUAAGU</u> <u>UCUGCACCU</u>	63

miR-27b-2	<u>ACCUCUCUAACAAGGUGCAGAGCUUAGCUGAU</u> <u>UGGUGAACAGUGAUUGGUUCCGCUUUGUUCA</u> <u>CAGUGGCUAAGUUCUGCACCUGAAGAGAAGGU</u> <u>G</u>	64
miR-27-19	<u>CCUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA</u> <u>GGGUCCACACCAAGUCGUGUUCACAGUGGCUA</u> <u>AGUUCCGCCCCCCAGG</u>	65
miR-28	<u>GGUCCUUGCCCUCAAGGAGCUCACAGUCUAUU</u> <u>GAGUUAACCUUUCUGACUUUCCACUAGAUUGU</u> <u>GAGCUCCUGGAGGGCAGGCACU</u>	66
miR-29a-2	<u>CCUUCUGUGACCCCUUAGAGGAUGACUGAUUU</u> <u>CUUUUGGUGUUCAGAGUCAAUUAUUUUUA</u> <u>GCACCAUCUGAAAUCGGUUAUAAUGAUUGGGG</u> <u>AAGAGCACCAUG</u>	67
miR-29a	<u>AUGACUGAUUUUCUUUUGGUGUUCAGAGUCAAU</u> <u>AUAAUUUUUCUAGCACCAUCUGAAAUCGGUUAU</u>	68
miR-29b-1	<u>CUUCAGGAAGCUGGUUUCAUUAGGUGGUUUAG</u> <u>AUUUAAAUAGUGAUUGUCUAGCACCAUUUGAA</u> <u>AUCAGUGUUCUUGGGGG</u>	69
miR-29b-2	<u>CUUCUGGAAGCUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG</u> <u>AUUUUCCAUCUUUGUAUCUAGCACCAUUUGA</u> <u>AAUCAGUGUUUUAGGAG</u>	70
miR-29c	<u>ACCACUGGCCCAUCUCUACACAGGCUGACCG</u> <u>AUUUCUCCUGGUGUUCAGAGUCUGUUUUUGUC</u> <u>UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUAUGAUGUAGGG</u> <u>GGAAAAGCAGCAGC</u>	71
miR-30a	<u>GCGACUGUAAACAUCCUCGACUGGAAGCUGUG</u> <u>AAGCCACAGAUGGGCUUUCAGUCGGAUGUUUG</u> <u>CAGCUGC</u>	72
miR-30b-1	<u>AUGUAAACAUCCUACACUCAGCUGUAAUACAU</u> <u>GGAUUGGCUGGGAGGUGGAUGUUUACGU</u>	73
miR-30b-2	<u>ACCAAGUUUCAGUUCAUGUAAACAUCCUACAC</u> <u>UCAGCUGUAAUACAUGGAUUGGCUGGGAGGUG</u> <u>GAUGUUUACUUCAGCUGACUUGGA</u>	74
miR-30c	<u>AGAUACUGUAAACAUCCUACACUCUCAGCUGU</u> <u>GGAAAGUAAGAAAGCUGGGAGAAGGCUGUUUA</u> <u>CUCUUUCU</u>	75
miR-30d	<u>GUUGUUGUAAACAUCCCCGACUGGAAGCUGUA</u> <u>AGACACAGCUAAGCUUUCAGUCAGAUGUUUGC</u> <u>UGCUCAC</u>	76
miR-30e	<u>CUGUAAACAUCCUUGACUGGAAGCUGUAAGGU</u> <u>GUUCAGAGGAGCUUUCAGUCGGAUGUUUACAG</u>	77
miR-31	<u>GGAGAGGAGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUGUUG</u> <u>AACUGGGAACCUGCUAUGCCAACAUAUUGCCA</u> <u>UCUUUCC</u>	78
miR-32	<u>GGAGAUUUGCACAUUACUAAGUUGCAUGUUG</u> <u>UCACGGCCUCAUGCAAUUUAGUGUGUGUGAU</u> <u>AUUUUC</u>	79
miR-33b	<u>GGGGGCCGAGAGAGGGCGGGCGGCCCCCGCGGUG</u> <u>CAUUGCUGUUGCAUUGCACGUGUGUGAGGCGG</u> <u>GUGCAGUGCCUCGGCAGUGCAGCCCGGAGCCG</u> <u>GCCCCUGGCACCAC</u>	80

miR-33b-2	<u>ACCAAGUUUCAGUUCAUGUAAACAUCUACAC</u> <u>UCAGCUGUAAUACAUGGAUUGGCUGGGAGGUG</u> <u>GAUGUUUACUUCAGCUGACUUGGA</u>	81
miR-33	<u>CUGUGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUGUUCU</u> <u>GGUGGUACCCAUGCAAUGUUUCCACAGUGCAU</u> <u>CACAG</u>	82
miR-34-a	<u>GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCU</u> <u>UAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGC</u> <u>AAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGC</u> <u>ACGUUGUGGGGCC</u>	83
miR-34-b	<u>GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUUAGCUGA</u> <u>UUGUACUGUGGUGGUUACAAUCACUAACUCCA</u> <u>CUGCCAUCAAAACAAGGCAC</u>	84
miR-34-c	<u>AGUCUAGUUACUAGGCAGUGUAGUUAGCUGAU</u> <u>UGC UAAUAGUACCAUUCACUAACCACACGGCC</u> <u>AGGUAAAAAGAUU</u>	85
miR-91-13	<u>UCAGAAUAAUGUCAAGUGCUUACAGUGCAGG</u> <u>UAGUGAU AUGUGCAUCUACUGCAGUGAAGGCA</u> <u>CUUGUAGCAUUAUGGUGA</u>	86
miR-92-1	<u>CUUUCUACACAGGUUGGGAUCCGGUUGCAAUGC</u> <u>UGUGUUUCUGUAUGGUUAUUGCACUUGUCCCGG</u> <u>CCUGUUGAGUUUGG</u>	87
miR-92-2	<u>UCAUCCCUGGGUGGGGAUUUGUUGCAUUACUU</u> <u>GUGUUCUAUAUAAAGUAUUGCACUUGUCCCGG</u> <u>CCUGUGGAAGA</u>	88
miR-93-1 (miR-93-2)	<u>CUGGGGGCUCCAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUA</u> <u>GUGUGAUUACCCAACCUACUGCUGAGCUAGCA</u> <u>CUUCCCGAGCCCCCGG</u>	89
miR-95-4	<u>AACACAGUGGGCACUCAAUAAAUGUCUGUUGA</u> <u>AUUGAAAUGCGUUA CAUUC AACGGGUUUUAU</u> <u>UGAGCACCCACUCUGUG</u>	90
miR-96-7	<u>UGGCCGAUUUUGGCACUAGCACAUUUUUGCUU</u> <u>GUGUCUCUCCGCUCUGAGCAAUCAUGUGCAGU</u> <u>GCCAAUAUGGGAAA</u>	91
miR-97-6 (miR-30*)	<u>GUGAGCGACUGUAAACAUCCUCGACUGGAAGC</u> <u>UGUGAAGCCACAGAUGGGCUUUCAGUCGGAUG</u> <u>UUUGCAGCUGCCUACU</u>	92
miR-98	<u>GUGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUUGUGGGGUA</u> <u>GGGAUAUUAGGCCCAAUUAGAAGAUAAUAU</u> <u>ACAACUUACUACUUCC</u>	93
miR-99b	<u>GGCACCCACCCGUAGAACCGACCUUGCGGGGCC</u> <u>UUCGCCGCACACAAGCUCGUGUCUGUGGGUCC</u> <u>GUGUC</u>	94
miR-99a	<u>CCCAUUGGCAUAAACCCGUAGAUCCGAUCUUG</u> <u>UGGUGAAGUGGACCGCACAAAGCUCGCUUCUAU</u> <u>GGGUCUGUGUCAGUGUG</u>	95
miR-100-1/2	<u>AAGAGAGAAGAUUUGAGGCCUGUUGCCACAA</u> <u>ACCCGUAGAUCCGAACUUGUGGUUUAGUCCG</u> <u>CACAAGCUUGUAUCUAUAGGU AUGUGUCUGUU</u> <u>AGGCAAUCUCAC</u>	96
miR-100-11	<u>CCUGUUGCCACAAACCCGUAGAUCCGAACUUG</u> <u>UGGUAUUAGUCCGCACAAGCUUGUAUCUAUAG</u> <u>GUAUGUGUCUGUUAGG</u>	97

miR-101-1/2	AGGCUGCCCUGGCUCAGUUAUCACAGUGCUGA UGCUGUCUAUUCUAAAGGUACAGUACUGUGAU <u>AACUGAAGGAUGGCAGCCAUCUACCUUCCA</u> CAGAGGAGCCUCAC	98
miR-101	UCAGUUAUCACAGUGCUGAUGCUGUCCAUUCU AAAGGUACAGUACUGUGAUAAACUGA	99
miR-101-1	UGCCCUGGCUCAGUUAUCACAGUGCUGAUGC GUCUAUUCUAAAGGU <u>ACAGUACUGUGAUAA</u> GAAGGAUGGCA	100
miR-101-2	ACUGUCCUUUUUCGGUUAUCAUGGUACCGAUG CUGUAUAUCUGAAAGGUACAGUACUGUGAUAA CUGAAGAAUGGUGGU	101
miR-101-9	UGUCCUUUUUCGGUUAUCAUGGUACCGAUGC GUAUAUCUGAAAGGUACAGUACUGUGAUAA GAAGAAUGGUG	102
miR-102-1	CUUCUGGAAGCUGGUUUCACAUGGUGGCCUUAG AUUUUCCAUCUUGUAUCUAGCACCAUUUGA AAUCAGUGUUUAGGAG	103
miR-102-7.1 (miR-102-7.2)	CUUCAGGAAGCUGGUUUCAUUAGGUGGUUAG AUUUA AAUAGUGAUUGUCUAGCACCAUUUGAA AUCAGUGUUCUUGGGGG	104
miR-103-2	UUGUGCUUUCAGCUUCUUACAGUGCUGCCUU GUAGCAUUCAGGUCAAGCAACA <u>UUGUACAGGG</u> CUAUGAAAGAACCA	105
miR-103-1	UACUGCCCUCGGCUUCUUUACAGUGCUGCCUU GUUGCAUAUGGAUCAAGCAGCAUUGUACAGGG CUAUGAAGGCAUUG	106
miR-104-17	AAAUGUCAGACAGCCCAUCGACUGGUGUUGCC AUGAGAUUCAACAGUCAACAUCAGUCUGAUAA GCUACCCGACAAGG	107
miR-105-1	UGUGCAUCGUGGUCAAAUGCUCAGACUCCUGU GGUGGCUGUCUAUGCACCACGGAUGUUGAGC AUGUGCUACGGUGUCUA	108
miR-105-2	UGUGCAUCGUGGUCAAAUGCUCAGACUCCUGU GGUGGCUGUCUAUGCACCACGGAUGUUGAGC AUGUGCUAUGGUGUCUA	109
miR-106-a	CCUUGGCCAUGUA <u>AAAAGUGC</u> UACAGUGCAGG <u>UAGCUUUU</u> GAGAUUCUACUGCAAUGUAAGCAC UUCUUACA <u>UACCAUGG</u>	110
miR-106-b	CCUGCCGGGGCUAAAGUGCUGACAGUGCAGAU AGUGGUCCUCUCCGUGCUACCGCACUGUGGGU ACUUGCUGCUCCAGCAGG	111
miR-107	CUCUCUGCUUUCAGCUUCUUUACAGUGUUGCC UUGUGGCAUGGAGUUAAGCAGCAUUGUACAG GGCUAUCAAAGCACAGA	112
miR-108-1-small	ACACUGCAAGAACAUAAGGAUUUUUAGGGGC AUUAUGACUGAGUCAGAAAACACAGCUGCCCC UGAAAGUCCCUCAUUUUUCUUGCUGU	113
miR-108-2-small	ACUGCAAGAGCAAUAAGGAUUUUUAGGGGCAU UAUGAUAGUGGAAUGGAAACACAUCUGCCCC AAAAGUCCCUCAUUUU	114

miR-122a-1	<u>CCUUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUG</u> <u>UUUGUGUCUAAACUAUCAAACGCCAUUAUCAC</u> <u>ACUAAAUAGCUACUGCUAGGC</u>	115
miR-122a-2	<u>AGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCC</u> <u>AAACUAUCAAACGCCAUUAUCACACUAAAUAG</u> <u>CU</u>	116
miR-123	<u>ACAUUAAUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACU</u> <u>UCAAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGC</u>	117
miR-124a-1	<u>AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUU</u> <u>GAUUUAAAUGUCCAUAACAAUUAAGGCACGCGG</u> <u>UGAAUGCCAAGAAUGGGGCGUG</u>	118
miR-124a-2	<u>AUCAAGAUUAGAGGCUCUCUCUCCGUGUUCA</u> <u>CAGCGGACCUUGAUUUAAUGUCAUACAAUUA</u> <u>GGCACGCGGUGAAUGCCAAGAGCGGAGCCUAC</u> <u>GGCUGCACUUGAAG</u>	119
miR-124a-3	<u>UGAGGGCCCCUCUGCGUGUUCACAGCGGACCU</u> <u>UGAUUUAAUGUCUAUACAAUUAAGGCACGCGG</u> <u>UGAAUGCCAAGAGAGGGCGCCUCC</u>	120
miR-124a	<u>CUCUGCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAU</u> <u>GUCUAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA</u> <u>AGAG</u>	121
miR-124b	<u>CUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAU</u> <u>GUCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA</u> <u>GAG</u>	122
miR-125a-1	<u>UGCCAGUCUCUAGGUCCCUGAGACCCUUUAAC</u> <u>CUGUGAGGACAUCCAGGGUCACAGGUGAGGUU</u> <u>CUUGGGAGCCUGGGCGUCUGGCC</u>	123
miR-125a-2	<u>GGUCCCUGAGACCCUUUAACCUUGUGAGGACAU</u> <u>CCAGGGUCACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCCUG</u> <u>G</u>	124
miR-125b-1	<u>UGCUCUCCUCUCAGUCCCUGAGACCCUAACUU</u> <u>GUGAUGUUUACCGUUUAAAUCCACGGGUUAGG</u> <u>CUCUUGGGAGCUGCGAGUCGUGCU</u>	125
miR-125b-2	<u>ACCAGACUUUCCUAGUCCCUGAGACCCUAAC</u> <u>UUGUGAGGUAAUUUAGUAACAUCACAAGUCAG</u> <u>GCUCUUGGGACCUAGGCGGAGGGGA</u>	126
miR-126-1	<u>CGCUGGGCGACGGGACAUAUUACUUUUGGUAC</u> <u>GCGCUGUGACACUCAAACUCGUACCGUGAGU</u> <u>AAUAAUGCGCCGUCCACGGCA</u>	127
miR-126-2	<u>ACAUUAAUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACU</u> <u>UCAAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGC</u>	128
miR-127-1	<u>UGUGAUCACUGUCUCCAGCCUGCUGAAGCUCA</u> <u>GAGGGCUCUGAUUCAGAAAGAUAUCGGAUCC</u> <u>GUCUGAGCUUGGCUGGUCGGAAGUCUCAUCAU</u> <u>C</u>	129
miR-127-2	<u>CCAGCCUGCUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAUUC</u> <u>AGAAAGAUCAUCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU</u> <u>GGUCGG</u>	130
miR-128a	<u>UGAGCUGUUGGAUUCGGGGCCGUAGCACUGUC</u> <u>UGAGAGGUUUACAUUUCUCACAGUGAACCGGU</u> <u>CUCUUUUUCAGCUGCUUC</u>	131

<i>miR-128b</i>	<u>GCCCGGCAGCCACUGUGCAGUGGGGAAGGGGGG</u> <u>CCGAUACACUGUACGAGAGUGAGUAGCAGGUC</u> <u>UCACAGUGAACCGGUCUCUUUCCCUACUGUGU</u> <u>CACACUCCUAAUGG</u>	132
<i>miR-128</i>	<u>GUUGGAUUCGGGGCCGUAGCACUGUCUGAGAG</u> <u>GUUUACAUUUCUCACAGUGAACCGGUCUCUUU</u> <u>UUCAGC</u>	133
<i>miR-129-1</i>	<u>UGGAUCUUUUUGCGGUCUGGGGCUUGCUGUUC</u> <u>UCUCAACAGUAGUCAGGAAGCCCUUACCCCAA</u> <u>AAAGUAUCUA</u>	134
<i>miR-129-2</i>	<u>UGCCCUUCGCGAAUCUUUUUGCGGUCUGGGCU</u> <u>UGCUGUACAUAACUCAAUAGCCGGAAGCCCUU</u> <u>ACCCCAAAAAGCAUUUGCGGAGGGCG</u>	135
<i>miR-130a</i>	<u>UGCUGCUGGCCAGAGCUCUUUUCACAUAUGUC</u> <u>UACUGUCUGCACCUGUCACUAGCAGUGCAAUG</u> <u>UUA AAAAGGGCAUUGGCCGUGUAGUG</u>	136
<i>miR-131-1</i>	<u>GCCAGGAGGCGGGGUUGGUUGUUAUCUUUGGU</u> <u>UAUCUAGCUGUAUGAGUGGUGUGGAGUCUUCA</u> <u>UAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAAAAUAACCC</u> <u>CAUACACUGCGCAG</u>	137
<i>miR-131-3</i>	<u>CACGGCGCGGCAGCGGCACUGGCCUAAGGGAGG</u> <u>CCCGUUUCUCUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUG</u> <u>AGUGCCACAGAGCCGUCAUAAAGCUAGAUAAC</u> <u>CGAAAGUAGAAAUG</u>	138
<i>miR-131</i>	<u>GUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGU</u> <u>GUAUUGGUCUUCAUAAAGCUAGAUAAACCGAAA</u> <u>GUAAAAAC</u>	139
<i>miR-132-1</i>	<u>CCGCCCCCGCGUCUCCAGGGCAACCGUGGCCUUU</u> <u>CGAUUGUUAUCUGUGGGAACUGGAGGUAAACAGU</u> <u>CUACAGCCAUGGUCGCCCCGCAGCACGCCACG</u> <u>CGC</u>	140
<i>miR-132-2</i>	<u>GGGCAACCGUGGCCUUUCGAUUGUUAUCUGUGGG</u> <u>AACUGGAGGUAAACAGUCUACAGCCAUGGUCGC</u> <u>CC</u>	141
<i>miR-133a-1</i>	<u>ACAAUGC UUUGCUAGAGCUGGUAAAAUGGAAC</u> <u>CAAUUCGCCUCUCAAUGGAUUUGGUCCCCUU</u> <u>CAACCAGCUGUAGCUAUGCAUUGA</u>	142
<i>miR-133a-2</i>	<u>GGGAGCCAAAUGCUUUGCUAGAGCUGGUAAAA</u> <u>UGGAACCAAUUCGACUGUCCAUGGAUUUGGU</u> <u>CCCCUUAACCAGCUGUAGCUGUGCAUUGAUG</u> <u>GCGCCG</u>	143
<i>miR-133</i>	<u>GCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAAUUCGCCU</u> <u>CUUCA AUGGAUUUGGUCCCCUUAACCAGCUG</u> <u>UAGC</u>	144
<i>miR-133b</i>	<u>CCUCAGAAGAAAGAUGCCCCUGCUCUGGCUG</u> <u>GUCAAAACGGAACCAAGUCCGUCUUCUGAGAG</u> <u>GUUUGGUCCCCUUAACCAGCUACAGCAGGGC</u> <u>UGGCAAUGCCCAGUCCUUGGAGA</u>	145
<i>miR-133b-small</i>	<u>GCCCCUGCUCUGGCUGGUCAAACGGAACCAA</u> <u>GUCCGUCUUCUGAGAGGUUUGGUCCCCUUA</u> <u>ACCAGCUACAGCAGGG</u>	146

miR-134-1	<u>CAGGGUGUGUGACUGGUUGACCAGAGGGGCAU</u> <u>GCACUGUGUUCACCCUGUGGGCCACCUAGUCA</u> <u>CCAACCCUC</u>	147
miR-134-2	<u>AGGGUGUGUGACUGGUUGACCAGAGGGGCAUG</u> <u>CACUGUGUUCACCCUGUGGGCCACCUAGUCAC</u> <u>CAACCCU</u>	148
miR-135a-1	<u>AGGCCUCGCUGUUCUCUAUGGCCUUUUUAUUC</u> <u>UAUGUGAUUCUACUGCUCACUCAUAUAGGGAU</u> <u>UGGAGCCGUGGGCGCACGGCGGGGACA</u>	149
miR-135a-2 (miR-135-2)	<u>AGAUAUUUCACUCUAGUGCUUUUAUGGCCUUU</u> <u>UAUUCCUAUGUGAUAGUAAUAAAGUCUCAUGU</u> <u>AGGGAUGGAAGCCAUGAAAUACAUGUGAAAA</u> <u>AUCA</u>	150
miR-135	<u>CUAUGGCCUUUUUAUUCCUAUGUGAUUCUACUG</u> <u>CUCACUCAUAUAGGGAUUGGAGCCGUGG</u>	151
miR-135b	<u>CACUCUGCUGUGGGCCUAUGGCCUUUUCAUUCCU</u> <u>AUGUGAUUGCUGUCCAAACUCAUGUAGGGCU</u> <u>AAAAGCCAUGGGCUACAGUGAGGGGCGAGCUC</u> <u>C</u>	152
miR-136-1	<u>UGAGCCCUCGGAGGACUCCAUUUGUUUUGAUG</u> <u>AUGGAUUCUUAUGCUCUCAUCGUCUCAAAU</u> <u>GAGUCUUCAGAGGGUUCU</u>	153
miR-136-2	<u>GAGGACUCCAUUUGUUUUGAUGAUGGAUUCUU</u> <u>AUGCUCUCAUCGUCUCAAAUGAGUCUUC</u>	154
miR-137	<u>CUUCGGUGACGGGUAAUUCUUGGGUGGAUAAUA</u> <u>CGGAUUACGUUGUUAUUGCUUAAGAAUACGCG</u> <u>UAGUCGAGG</u>	155
miR-138-1	<u>CCCUGGCAUGGUGUGGUGGGGCAGCUGGUGUU</u> <u>GUGAAUCAGGCCGUUGCCAUCAGAGAACGGC</u> <u>UACUUCACAACACCAGGGCCACACCACACUACA</u> <u>GG</u>	156
miR-138-2	<u>CGUUGCUGCAGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG</u> <u>ACGAGCAGCGCAUCCUCUUAACCCGGCUAUUUC</u> <u>ACGACACCAGGGUUGCAUCA</u>	157
miR-138	<u>CAGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGACGAGCAG</u> <u>CGCAUCCUCUUAACCCGGCUAUUUCACGACACCA</u> <u>GGGUUG</u>	158
miR-139	<u>GUGUAUUCUACAGUGCACGUGUCUCCAGUGUG</u> <u>GCUCGGAGGCUGGAGACGCGGCCCUUUGGAG</u> <u>UAAC</u>	159
miR-140	<u>UGUGUCUCUCUCUGUGUCCUGCCAGUGGUUUU</u> <u>ACCCUAUGGUAGGUUACGUCAUGCUGUUCUAC</u> <u>CACAGGGUAGAACCACGGACAGGAUACCGGGG</u> <u>CACC</u>	160
miR-140as	<u>UCCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGGUUA</u> <u>CGUCAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCAC</u> <u>GGACAGGA</u>	161
miR-140s	<u>CCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGGUUAC</u> <u>GUCAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCACG</u> <u>GACAGG</u>	162
miR-141-1	<u>CGGCCGGCCUGGGUCCAUCUUCAGUACAGU</u> <u>GUUGGAUGGUCUAAUUGUGAAGCUCCUAAACAC</u> <u>UGUCUGGUAAAGAUGGCUCCCGGGUGGGUUC</u>	163

miR-141-2	GGGUCCAUCU <u>UCCAGUACAGUGUUGGAUGGUC</u> UAAUUGUGAAGCUCCU <u>AACACUGUCUGGUA</u> GAUGGCC	164
miR-142	ACCCAUAAGUAGAAAGCACUACUAACAGCAC UGGAGGGUGUAGUGUUUCCUACUUAUGGAUG	165
miR-143-1	GCGCAGCGCCUGUCUCCAGCCUGAGGGUGCA GUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGGGAGUCUGAG AUGAAGCACUGUAGCUCAGGAAGAGAGAAGUU GUUCUGCAGC	166
miR-143-2	CCUGAGGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUU GGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGG	167
miR-144-1	UGGGGCCCUGGCUGGGAUUAUCAUAUACUG UAAGUUUGCGAUGAGACACUACAGUAUAGAUG AUGUACUAGUCCGGGCACCC	168
miR-144-2	GGCUGGGAUUAUCAUAUAUCUGUAAGUUUGC GAUGAGACACUACAGUAUAGAUGAUGUACUAG UC	169
miR-145-1	CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUUUUCCAGGA AUCCCUUAGAUGCUAAGAUGGGGAUUCCUGGA AAUACUGUUCUUGAGGGUCAUGGUU	170
miR-145-2	CUCACGGUCCAGUUUUUCCAGGAAUCCCUUAG AUGCUAAGAUGGGGAUUCUGGAAAUACUGUU CUUGAG	171
miR-146-1	CCGAUGUGUAUCCUCAGCUUUGAGAACUGAAU UCCAUGGGUUGUGUCAGUGUCAGACCUCUGAA AUUCAGUUCUUCAGCUGGGAUUUCUCUGUCAU CGU	172
miR-146-2	AGCUUUGAGAACUGAAUCCAUGGGUUGUGUC AGUGUCAGACCUGUGAAAUUCAGUUCUUCAGC U	173
miR-147	AAUCUAAAGACAACAUUUCUGCACACACACCA GACUAUGGAAGCCAGUGUGUGGAAU <u>UGCUCU</u> GCUAGAUU	174
miR-148a (miR-148)	GAGGCAAAGUUCUGAGACACUCCGACUCUGAG UAUGAUAGAAGUCAGUGCACUACAGAACUUUG UCUC	175
miR-148b	CAAGCACGAUUAGCAUUUGAGGUGAAGUUCUG UUAUACACUCAGGCUGUGGCUCUCUGAAAGUC AGUGCAUCACAGAACUUUGUCUCGAAAGCUUU CUA	176
miR-148b-small	AAGCACGAUUAGCAUUUGAGGUGAAGUUCUGU UAUACACUCAGGCUGUGGCUCUCUGAAAGUCA GUGCAU	177
miR-149-1	GCCGGCGCCCGAGCUCUGGCUCGGUGUCUUCAC UCCCGUGCUUGUCCGAGGAGGGAGGGAGGGAC GGGGGUCUGUCUGGGGCAGCUGGA	178
miR-149-2	GCUCUGGCUCGGUGUCUUCACUCCCGUGCUUG UCCGAGGAGGGAGGGAGGGAC	179
miR-150-1	CUCCCCAUGGCCUGUCUCCCAACCCUUGUACC AGUGCUGGGCUCAGACCCUGGUACAGGCCUGG GGACAGGGACCUGGGGAC	180
miR-150-2	CCUGUCUCCCAACCCUUGUACCAGUGCUGGGC UCAGACCCUGGUACAGGCCUGGGGGACAGGG	181

miR-151	UUUCCUGCCCUCGAGGAGCUCACAGUCUAGUA UGUCUCAUCCCCUACUAGACUGAAGCUCCUUG AGGACAGG	182
miR-151-2	CCUGUCCUCAAGGAGCUUCAGUCUAGUAGGGG AUGAGACAUACUAGACUGUGAGCUCCUCGAGG GCAGG	183
miR-152-1	UGUCCCCCCC GGCCCAGGUUCUGUGAUACACUC CGACUCGGGCUCUGGAGCAGUCAGUGCAUGAC AGAACUUGGGCCCCGGAAGGACC	184
miR-152-2	GGCCCAGGUUCUGUGAUACACUCCGACUCGGG CUCUGGAGCAGUCAGUGCAUGACAGAACUUGG GCCCCGG	185
miR-153-1-1	CUCACAGCUGCCAGUGUCAUUUUUGUGAUCUG CAGCUAGUAUUCUCACUCCAGUUGCAUAGUCA CAAAGUGAUCAUUGGCAGGUGUGGC	186
miR-153-1-2	UCUCUCUCUCCUCACAGCUGCCAGUGUCAUJ GUCACAAAAGUGAUCAUUGGCAGGUGUGGCUG CUGCAUG	187
miR-153-2-1	AGCGGUGGCCAGUGUCAUUUUUGUGAUGUUGC AGCUAGUAAUAUGAGCCCAGUUGCAUAGUCAC AAAAGUGAUCAUUGGAAACUGUG	188
miR-153-2-2	CAGUGUCAUUUUUGUGAUGUUGCAGCUAGUAA UAUGAGCCCAGUUGCAUAGUCACAAAAGUGAU CAUUG	189
miR-154-1	GUGGUACUUGAAGAUAGGUUAUCCGUGUUGCC UUCGCUUUAUUUGUGACGAAUCAUACACGGUU GACCUAUUUUUCAGUACCAA	190
miR-154-2	GAAGAUAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCGCUUUA UUUGUGACGAAUCAUACACGGUUGACCUAUUU UU	191
miR-155	CUGUUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUUUUUGC CUCCAACUGACUCCUACAUAUUAGCAUUAACA G	192
miR-156 = miR-157=overla p miR-141	CCUAACACUGUCUGGUAAAGAUGGCUCCCGGG UGGGUUCUCUCGGCAGUAACCUUCAGGGAGCC CUGAAGACCAUGGAGGAC	193
miR-158-small = miR-192	GCCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAU GAUUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCU GGCUGCCAAUCCAUAAGGUCACAGGUAUGUUC GCCUCA AUGCCAGC	194
miR-159-1-small	UCCCGCCCCUGUAACAGCAACUCCAUGUGGA AGUGCCCACUGGUUCCAGUGGGGCUGCUGUUA UCUGGGGCGAGGGCCA	195
miR-161-small	AAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAGGAUGAG GUGACUGGUCUGGGCUACGCUAUGCUGCGGCG CUCGGG	196
miR-163-1b-small	CAUUGGCCUCCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUC GAGUCCACCCGGGGUAAAGAAAGGCCGAAUU	197
miR-163-3-small	CCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUCGAGUCCAC CUGGGGUAGAGGUGAAAGUCCUUUUACGGAA UUUUUU	198

miR-162	<u>CAAUGUCAGCAGUGCCUUAGCAGCACGUAAAU</u> <u>AUUGGCGUUAAGA UUCUAAA UUAUCUCCAGU</u> <u>AUUAACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGACCAU</u> <u>ACUCUACAGUUG</u>	199
miR-175-small=miR-224	<u>GGGCUUUC AAGUCACUAGUGGUUCCGUUUAGU</u> <u>AGAUGAUUGUGCAUUGUUUCAAAAUGGUGCCC</u> <u>UAGUGACUACAAAGCCC</u>	200
miR-177-small	<u>ACGCAAGUGUCCUAAGGUGAGCUCAGGGAGCA</u> <u>CAGAAACCUCCAGUGGAACAGAAGGGCAAAAAG</u> <u>CUCAUU</u>	201
miR-180-small	<u>CAUGUGUCACUUUCAGGUGGAGUUUCAAGAGU</u> <u>CCCUUCCUGGUUCACCGUCUCCUUUGCUCUUC</u> <u>ACAAC</u>	202
miR-181a	<u>AGAAGGGCUAUCAGGCCAGCCUUCAGAGGACU</u> <u>CCAAGGAACA UUCAACGCUGUCGGUGAGUUUG</u> <u>GGAUUUGAAAAAACCACUGACCGUUGACUGUA</u> <u>CCUUGGGGUCCUUA</u>	203
miR-181b-1	<u>CCUGUGCAGAGAUUAUUUUUAAAAGGUCACA</u> <u>AUCAACA UUCAUUGCUGUCGGUGGGUUGAACU</u> <u>GUGUGGACAAGCUCACUGAACAAUGAAUGCAA</u> <u>CUGUGGCCCCCGCUU</u>	204
miR-181b-2	<u>CUGAUGGCUGCACUCAACA UUCAUUGCUGUCG</u> <u>GUGGGUUUGAGUCUGAAUCAACUCACUGAUCA</u> <u>AUGAAUGCAAACUGCGGACCAAACA</u>	205
miR-181c	<u>CGGAAA AUUUGCCAAGGGUUUGGGGGAACA UU</u> <u>CAACCUGUCGGUGAGUUUGGGCAGCUCAGGCA</u> <u>AACCAUCGACCGUUGAGUGGACCCUGAGGCCU</u> <u>GGAAUUGCCA UCCU</u>	206
miR-182-as	<u>GAGCUGCUUGCCUCCCCCGUUUUUGGCAAUG</u> <u>GUAGAACUCACACUGGUGAGGUAACAGGAUCC</u> <u>GGUGGUUCUAGACUUGCCAACUAUGGGGCGAG</u> <u>GACUCAGCCGGCAC</u>	207
miR-182	<u>UUUUUGGCAAUGGUAGAACUCACACUGGUGAG</u> <u>GUAACAGGAUCCGGUUGGUUCUAGACUUGCCAA</u> <u>CUAUGG</u>	208
miR-183	<u>CCGCAGAGUGUGACUCCUGUUCUGUGUAUGGC</u> <u>ACUGGUAGAAUUCACUGUGAACAGUCUCAGUC</u> <u>AGUGAAUUACCGAAGGGCCAUA AACAGAGCAG</u> <u>AGACAGAUCCACGA</u>	209
miR-184-1	<u>CCAGUCACGUCCCCUUAUCACUUUCCAGCCCA</u> <u>GCUUUGUGACUGUAAGUGUUGGACGGAGAACU</u> <u>GAUAAGGGUAGGUGAUUGA</u>	210
miR-184-2	<u>CCUUAUCACUUUCCAGCCCAGCUUUGUGACU</u> <u>GUAAGUGUUGGACGGAGAACUGAUAAAGGGUAG</u> <u>G</u>	211
miR-185-1	<u>AGGGGGCGAGGGAUUGGAGAGAAAGGCAGUUC</u> <u>CUGAUGGUCCCCUCCCCAGGGGCUGGCUUCC</u> <u>UCUGGUCCUCCC UCCA</u>	212
miR-185-2	<u>AGGGAUUGGAGAGAAAGGCAGUUC CUGAUGGU</u> <u>CCCCUCCCCAGGGGCUGGCUUCCUCUGGUCCU</u> <u>U</u>	213

miR-186-1	<u>UGC</u> UUGUAACUUUCCAAGAAUUCUCCUUUUG GGCUUUCUGGUUUUAUUUUAAGCCCAAAGGUG AAUUUUUUGGGAAGUUUGAGCU	214
miR-186-2	ACUUUCCAAGAAUUCUCCUUUUGGGCUUUCU GGUUUUAUUUUAAGCCCAAAGGUGAAUUUUU GGGAAGU	215
miR-187	GGUCGGGCUCACCAUGACACAGUGUGAGACUC GGGCUACAACACAGGACCCGGGGCGCUGCUCU GACCCUCUGUGUCUUGUGUUGCAGCCGGAGGG ACGCAGGUCCGCA	216
miR-188-1	UGCUCUCCUCUCUCACAUCCCUUGCAUGGUGGA GGGUGAGCUUUCUGAAAACCCCUCCACAUGC AGGGUUUGCAGGAUGGCGAGCC	217
miR-188-2	UCUCACAUCCCUUGCAUGGUGGAGGGUGAGCU UUCUGAAAACCCCUCCACAUGCAGGGUUUGC AGGA	218
miR-189-1	CUGUCGAUUGGACCCGCCUCCGGUGCCUACU GAGCUGAUUCAGUUCUCAUUUACACACUGG CUCAGUUCAGCAGGAACAGGAGUCGAGCCCU GAGCAA	219
miR-189-2	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUCAGUUCUC AUUUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACA GGAG	220
miR-190-1	UGCAGGCCUCUGUGUGAUUGUUUGAUUAUU AGGUUGUUAUUUAAUCCAACUAUAUAUCAAAC AUUUCCUACAGUGUCUUGCC	221
miR-190-2	CUGUGUGAUUAUGUUUGAUUAUUUAGGUUGUUA UUUAAUCCAACUAUAUAUCAAACAUAUCCUA CAG	222
miR-191-1	CGGCUGGACAGCGGGCAACGGAAUCCCAAAG CAGCUGUUGUCUCCAGAGCAUCCAGCUGCGC UUGGAUUUCGUCCCCUGCUCUCCUGCCU	223
miR-191-2	AGCGGGCAACGGAAUCCCAAAGCAGCUGUUG UCUCCAGAGCAUCCAGCUGCGCUUGGAUUUC GUCCCCUGCU	224
miR-192-2/3	CCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAUG AAUUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCUG GCUGCCA AUUCCAUAAGGUCACAGGUAUGUUCG CCUCA AUGCCAG	225
miR-192	GCCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAU GAAUUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCU GGCUGCCA AUUCCAUAAGGUCACAGGUAUGUUC GCCUCA AUGCCAGC	226
miR-193-1	CGAGGAUGGGAGCUGAGGGCUGGGUCUUUGCG GGCGAGAUGAGGGUGUCGGAUCAACUGGCCUA CAAAGUCCAGUUCUCGGCCCCCG	227
miR-193-2	GCUGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGAGGGUGUCG GAUCAACUGGCCUACAAAGUCCAGU	228
miR-194-1	AUGGUGUUAUCAAGUGUAACAGCAACUCCAUG UGGACUGUGUACCAAUUCCAGUGGAGAUGCU GUUACUUUUGAUGGUUACCAA	229
miR-194-2	GUGUAACAGCAACUCCAUGUGGACUGUGUACC AAUUUCCAGUGGAGAUGCUGUUACUUUUGAU	230

miR-195-1	<u>AGCUUCCCUGGCUCUAGCAGCACAGAAUUAU</u> <u>GGCACAGGGAAGCGAGUCUGCCAUAUUGGCU</u> <u>GUGCUGCUCCAGGCAGGGUGGUG</u>	231
miR-195-2	<u>UAGCAGCACAGAAUAUUGGCACAGGGAAGCG</u> <u>AGUCUGCCAUAUUGGCUGUGCUGCU</u>	232
miR-196-1	<u>CUAGAGCUUGAAUUGGAACUGCUGAGUGAAU</u> <u>AGGUAGUUUCAUGUUGUUGGGCCUGGGUUCU</u> <u>GAACACAACAUAUAAACCACCCGAUUCACG</u> <u>GCAGUACUGCUCC</u>	233
miR-196a-1	<u>GUGAAUUAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGGCCUG</u> <u>GGUUUCUGAACACAACAUAUAAACCACCCG</u> <u>AUUCAC</u>	234
miR-196a-2 (miR-196-2)	<u>UGCUCGCUCAGCUGAUCUGUGGCUUAGGUAGU</u> <u>UUCAUGUUGUUGGGAUUGAGUUUUGAACUCGG</u> <u>CAACAAGAAACUGCCUGAGUUACAUCAGUCGG</u> <u>UUUUCGUCGAGGGC</u>	235
miR-196	<u>GUGAAUUAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGGCCUG</u> <u>GGUUUCUGAACACAACAUAUAAACCACCCG</u> <u>AUUCAC</u>	236
miR-196b	<u>ACUGGUCGGUGAUUUAGGUAGUUUCCUGUUGU</u> <u>UGGGAUCCACCUUUCUCUCGACAGCACGACAC</u> <u>UGCCUUCAUUACUUCAGUUG</u>	237
miR-197	<u>GGCUGUGCCGGUAGAGAGGGCAGUGGGAGGU</u> <u>AAGAGCUCUUCACCCUUCACCACCUUCUCCACC</u> <u>CAGCAUGGCC</u>	238
miR-197-2	<u>GUGCAUGUGUAUGUAUGUGUGCAUGUGCAUGU</u> <u>GUAUGUGUAUGAGUGCAUGCGUGUGUGC</u>	239
miR-198	<u>UCAUUGGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUCCUGUG</u> <u>AUUUUUCCUUCUUCUCUAUAGAAUAAAUGA</u>	240
miR-199a-1	<u>GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGA</u> <u>GGCUCUCAUUGUGUACAGUAGUCUGCACAUG</u> <u>GUUAGGC</u>	241
miR-199a-2	<u>AGGAAGCUUCUGGAGAUCUGCUCCGUCGCC</u> <u>CAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGACAAUGCC</u> <u>GUUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGACUG</u> <u>GGCAAGGGAGAGCA</u>	242
miR-199b	<u>CCAGAGGACACCUCACUCCGUCUACCCAGUGU</u> <u>UUAGACUAUCUGUUCAGGACUCCCAAUUGUA</u> <u>CAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGGCUGGGCUGG</u> <u>GUUAGACCCUCGG</u>	243
miR-199s	<u>GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGA</u> <u>GGCUCUCAUUGUGUACAGUAGUCUGCACAUG</u> <u>GUUAGGC</u>	244
miR-200a	<u>GCCGUGGCCAUCUACUGGGCAGCAUUGGAUG</u> <u>GAGUCAGGUCUCUAAUACUGCCUGGUAUUGAU</u> <u>GACGGC</u>	245
miR-200b	<u>CCAGCUCGGGCAGCCGUGGCCAUUCUACUGGG</u> <u>CAGCAUUGGAUGGAGUCAGGUCUCUAAUACUG</u> <u>CCUGGUAUUGAUGACGGCGGAGCCUGCAGC</u> <u>CCCUCGUCUACCCAGCAGUGUUUGGGUGCGG</u>	246
miR-200c	<u>UUGGGAGUCUCUAAUACUGCCGGGUAUUGAUG</u> <u>GAGG</u>	247

miR-202	<u>GUUCCUUUUUCCUAUGCAUAUACUUCUUUGAG</u> <u>GAUCUGGCCUAAAGAGGUUAUAGGGCAUGGGAA</u> <u>GAUGGAGC</u>	248
miR-203	<u>GUGUUGGGGACUCGCGCGCUGGGUCCAGUGGU</u> <u>UCUUAACAGUUCAACAGUUCUGUAGCGCAAUU</u> <u>GUGAAAUGUUUAGGACCACUAGACCCGGCGGG</u> <u>CGCGGCGACAGCGA</u>	249
miR-204	<u>GGCUACAGUCUUUCUJUCAUGUGACUCGUGGAC</u> <u>UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCUGAGAAUAUAU</u> <u>GAAGGAGGCUGGGAAGGCAAAGGGACGUUCA</u> <u>UUGUCAUCACUGGC</u>	250
miR-205	<u>AAAGAUCUCAGACAAUCCAUGUGCUUCUCUU</u> <u>GUCCUUCAUUCCACCGGAGUCUGUCUCAUACC</u> <u>CAACCAGAUUUCAGUGGAGUGAAGUUCAGGAG</u> <u>GCAUGGAGCUGACA</u>	251
miR-206-1	<u>UGCUCCCGAGGCCACAUGCUUCUUUAUAUCC</u> <u>CCAUAUGGAUJACUUUGCUAUGGAAUGUAAGG</u> <u>AAGUGUGUGGUUUCGGCAAGUG</u>	252
miR-206-2	<u>AGGCCACAUGCUUCUUUAUAUCCCAUAUGGA</u> <u>UUACUUUGCUAUGGAAUGUAAGGAAGUGUGUG</u> <u>GUUUU</u>	253
miR-208	<u>UGACGGGCGAGCUUUUGGCCCGGGUUUAUACCU</u> <u>GAUGCUCACGUAUAAGACGAGCAAAAAGCUUG</u> <u>UUGGUCA</u>	254
miR-210	<u>ACCCGGCAGUGCCUCCAGGCGCAGGGCAGCCCC</u> <u>UGCCCACCGCACACUGCGCUGCCCCAGACCCAC</u> <u>UGUGCGUGUGACAGCGGCUGAUCUGUGCCUGG</u> <u>GCAGCGCGACCC</u>	255
miR-211	<u>UCACCUGGCCAUGUGACUUGUGGGCUUCCCUU</u> <u>UGUCAUCCUUCGCCUAGGGCUCUGAGCAGGGC</u> <u>AGGGACAGCAAAGGGGUGCUCAGUUGUCACUU</u> <u>CCCACAGCACGGAG</u>	256
miR-212	<u>CGGGGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCCGGCACC</u> <u>UUGGCUCUAGACUGCUUACUGCCCGGGCCGCC</u> <u>CUCAGUAACAGUCUCCAGUCACGGCCACCGAC</u> <u>GCCUGGCCCCCGCC</u>	257
miR-213-2	<u>CCUGUGCAGAGAUUAUUUUUUAAAAGGUCACA</u> <u>AUCAACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGUUGAACU</u> <u>GUGUGGACAAGCUCACUGAACAAUGAAUGCAA</u> <u>CUGUGGCCCCCGCUU</u>	258
miR-213	<u>GAGUUUUGAGGUUGCUUCAGUGAACAUUCAAC</u> <u>GCUGUCGGUGAGUUUGGAAUUAAAUCAAAAC</u> <u>CAUCGACCGUUGAUUGUACCCUAUGGCUAACC</u> <u>AUCAUCUACUCC</u>	259
miR-214	<u>GGCCUGGCUGGACAGAGUUGUCAUGUGUCUGC</u> <u>CUGUCUACACUUGCUGUGCAGAACAUCCGCUC</u> <u>ACCUGUACAGCAGGCACAGACAGGCAGUCACA</u> <u>UGACAACCCAGCCU</u>	260
miR-215	<u>AUCAUUCAGAAAUGGUUAUACAGGAAAUGACC</u> <u>UAUGAAUUGACAGACAAUAUAGCUGAGUUUGU</u> <u>CUGUCAUUUCUUUAGGCCAAUAUUCUGUAUGA</u> <u>CUGUGCUCUUCAA</u>	261

miR-216	<u>GAUGGCUGUGAGUUGGCUUAAUCUCAGCUGGC</u> <u>AACUGUGAGAUGUUCAUACAAUCCCUCACAGU</u> <u>GGUCUCUGGGAUUAUGCUAAACAGAGCAAUUU</u> <u>CCUAGCCCUCACGA</u>	262
miR-217	<u>AGUAUAAUUAUACAUAAGUUUUUGAUGUCGCA</u> <u>GAUACUGCAUCAGGAACUGAUUGGAUAAGAAU</u> <u>CAGUCACCAUCAGUUCCUAAUGCAUUGCCUUC</u> <u>AGCAUCUAAACAAG</u>	263
miR-218-1	<u>GUGAUAAUGUAGCGAGAUUUUCUGUUGUGCUU</u> <u>GAUCUAACCAUGUGGUUGCGAGGUAUGAGUAA</u> <u>AACAUGGUUCCGUCAAGCACCAUGGAACGUCA</u> <u>CGCAGCUUUCUACA</u>	264
miR-218-2	<u>GACCAGUCGCUGCGGGGCUUUCUUGUGCUU</u> <u>GAUCUAACCAUGUGGUGGAACGAUGGAAACGG</u> <u>AACAUGGUUCUGUCAAGCACCGCGGAAAGCAC</u> <u>CGUGCUCUCCUGCA</u>	265
miR-219	<u>CCGCCCGGGCCGCGGCUCUGAUUGUCCAAAC</u> <u>GCAAUUCUCGAGUCUAUGGCUCGCGGAGAG</u> <u>UUGAGUCUGGACGUCCCAGCCGCCGCCCCAA</u> <u>ACCUCGAGCGGG</u>	266
miR-219-1	<u>CCGCCCGGGCCGCGGCUCUGAUUGUCCAAAC</u> <u>GCAAUUCUCGAGUCUAUGGCUCGCGGAGAG</u> <u>UUGAGUCUGGACGUCCCAGCCGCCGCCCCAA</u> <u>ACCUCGAGCGGG</u>	267
miR-219-2	<u>ACUCAGGGGCUUCGCCACUGAUUGUCCAAACG</u> <u>CAAUUCUUGUACGAGUCUGCGGCCAACCGAGA</u> <u>AUUGUGGCUGGACAUCUGUGGCUGAGCUCGCG</u> <u>G</u>	268
miR-220	<u>GACAGUGUGGCAUUGUAGGGCUCACACCGUA</u> <u>UCUGACACUUGGGCGAGGGCACCAUGCUGAA</u> <u>GGUGUUCAUGAUGCGGUCUGGGAACUCCUCAC</u> <u>GGAUCUACUGAUG</u>	269
miR-221	<u>UGAACAUCCAGGUCUGGGGCAUGAACCGGCA</u> <u>UACAAUGUAGAUUUCUGUGUUCGUUAGGCAAC</u> <u>AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUCAGGCUACCU</u> <u>GGAAACAUGUUCUC</u>	270
miR-222	<u>GCUGCUGGAAGGUGUAGGUACCCUCAUUGGCU</u> <u>CAGUAGCCAGUGUAGAUCUGUCUUCGUAAU</u> <u>CAGCAGCUACAUCUGGCUACUGGGUCUCUGAU</u> <u>GGCAUCUUCUAGCU</u>	271
miR-223	<u>CCUGGCCUCCUGCAGUGCCACGCUCGUGUAU</u> <u>UUGACAAGCUGAGUUGGACACUCCAUGUGGUA</u> <u>GAGUGUCAGUUUGUCAAAUACCCCAAGUGCGG</u> <u>CACAUGCUIACCAG</u>	272
miR-224	<u>GGCUIUCAAGUCACUAGUGGUUCCGUUUAGU</u> <u>AGAUGAUUGUGCAUUGUUUCAAAAUGGUGCCC</u> <u>UAGUGACUACAAAGCCC</u>	273
Nombre del precursor	Secuencia (5' a 3')*	SEC ID N°
miR-294-1 (chr16)	<u>CAAUCUCCUUAUCAUGGUUUGAUUUUUC</u> <u>GUGCUICCUUAUGUGUGAGAGAAGUA</u>	274

miR-296	AGGACCCUUCAGAGGGCCCCCCUCAAUCCUG UUGUGCCUAAUUCAGAGGGUUGGGUGGAGGCU CUCUGAAGGGCUCU	275
miR-299	AAGAAAUGGUUUACCGUCCCAUACAUUUUG AAUAUGUAUGUGGGGAUGGUAAACCGCUUCU ACUGCUAACGAAUGCUCUGACUUUAUUGCACU	276
miR-301	ACUGUACUUACAGCUAGCAGUGCAAUAGUAU UGUCAAGCAUCUGAAAGCAGG	277
miR-302a	CCACCACUUAAACGUGGAUGUACUUGC UUUGA AACUAAAGAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUUGGU GAUGG	278
miR-302b	GCUCCCUUCAACUUUAACAUGGAAGUGCUUUC UGUGACUUUA:AAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUU AGUAGGAGU	279
miR-302c	CCUUUGC UUUAACAUGGGGGUACCUGCUGUGU GAAACAAAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUG GAGG	280
miR-302d	CCUCUACUUUAACAUGGAGGCACUUGCUGUGA CAUGACAAAAUAAGUGCUUCCAUGUUUGAGU GUGG	281
miR-320	GCUUCGCUCCCCUCCGCCUUCUCUCCCGGUUC UCCCGGAGUCGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGG GCGAAAAGGAUGAGGU	282
miR-321	UUGGCCUCCUAAAGCCAGGGAUUGUGGGUUCGA GUCCACCCGGGGUAAAGAAAGGCCGA	283
miR-323	UUGGUACUUGGAGAGAGGUGGUCGUGGCGCG UUCGCUUUAUUUAUGGCGCACAUACACGGUC GACCUCUUUGCAGUAUCUAAUC	284
miR-324	CUGACUAUGCCUCCCCGCAUCCCUAGGGCAUU GGUGUAAAGCUGGAGACCCACUGCCCCAGGUG CUGCUGGGGGUUGUAGUC	285
miR-325	AUACAGUGC UGGUUCUAGUAGGUGUCCAGU AAGUGUUUGUGACAUAUUUUGUUUAUUGAGGA CCUCCUAUCAAUCAAGCACUGUGCUAGGCUCU GG	286
miR-326	CUCAUCUGUCUGUUGGGCUGGAGGCAGGGCCU UUGUGAAGGCGGGUGGUGCUCAGAUCGCCUCU GGGCCUUCUCCAGCCCCGAGGCGGAUUCA	287
miR-328	UGGAGUGGGGGGGCAGGAGGGGCUCAGGGAGA AAGUGCAUACAGCCCCUGGCCUCUCUGCCCUU CCGUCCCCUG	288
miR-330	CUUUGGCGAUCACUGCCUCUCUGGGCCUGUGU CUUAGGCUCUGCAAGAUAACCGAGCAAAGCA CACGGCCUGCAGAGAGGCAGCGCUCUGCCC	289
miR-331	GAGUUUGGUUUUGUUUGGGUUUGUUCUAGGUA UGGUCCAGGGAUCCAGAUAACACAGGCC CUGGGCCUAUCCUAGAACCAACCUAAGCUC	290
miR-335	UGUUUUGAGCGGGGGUCAAGAGCAAUAACGAA AAAUGUUUGUCAUAACCGUUUUUCAUUAUUG CUCUGACCUCUCUCAUUUGCUAUAUUA	291
miR-337	GUAGUCAGUAGUUGGGGGUGGGGAACGGCUUC AUACAGGAGUUGAUGCACAGUUAUCCAGCUCC UAUAUGAUGCCUUUCUUCAUCCCCUCAA	292

miR-338	<u>UCUCCAACAUAUCCUGGUGCUGAGUGAUGAC</u> <u>UCAGGCGACUCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUGA</u> <u>AGA</u>	293
miR-339	<u>CGGGGCGGCCGCUCUCCCUGUCCUCCAGGAGCU</u> <u>CACGUGUGCCUGCCUGUGAGCGCCUCGACGAC</u> <u>AGAGCCGGCGCCUGCCCCAGUGUCUGCGC</u>	294
miR-340	<u>UUGUACCUGGUGUGAUUAUAAAAGCAAUGAGAC</u> <u>UGAUUGUCAUAUGUCGUUUGUGGGGAUCCGUCU</u> <u>CAGUUACUUUAUAGCCAUACCUGGUAUCUUA</u>	295
miR-342	<u>GAAACUGGGCUCAAGGUGAGGGGUGCUAUCUG</u> <u>UGAUUGAGGGACAUGGUUAAUGGAAUUGUCUC</u> <u>ACACAGAAUUCGCACCCGUCACCUUGGCCUAC</u> <u>UUA</u>	296
miR-345	<u>ACCCAAACCCUAGGUCUGCUGACUCCUAGUCC</u> <u>AGGGCUCGUGAUGGCUGGUGGGCCCUGAACGA</u> <u>GGGGUCUGGAGGCCUGGGUUUGAAUAUCGACA</u> <u>GC</u>	297
miR-346	<u>GUCUGUCUGCCC GCAUGCCUGCCUCUCUGUUG</u> <u>CUCUGAAGGAGGCAGGGGCUGGGCCUGCAGCU</u> <u>GCCUGGGCAGAGCGGCUCCUGC</u>	298
miR-367	<u>CCAUACUGUUGC UAAUAUGCAACUCUGUUGA</u> <u>AUAUAAAUUGGAAUUGCACUUAGCAAUGGUG</u> <u>AUGG</u>	299
miR-368	<u>AAAAGGUGGAUAUUCUUCUAUGUUUAUGUUA</u> <u>UUUAUGGUUAAACAUAAGAGGAAAUUCCACGUU</u> <u>UU</u>	300
miR-369	<u>UUGAAGGGAGAUCGACCGUGUUUAUUCGCUU</u> <u>UAUUGACUUCGAAUAAUACAUGGUUGAUCUUU</u> <u>UCUCAG</u>	301
miR-370	<u>AGACAGAGAAGCCAGGUCACGUCUCUGCAGUU</u> <u>ACACAGCUCACGAGUGCCUGCUGGGGUGGAAC</u> <u>CUGGUCUGUCU</u>	302
miR-371	<u>GUGGCACUCA AACUGUGGGGGCACUUUCUGCU</u> <u>CUCUGGUGAAAGUGCCGCAUCUUUUGAGUGU</u> <u>UAC</u>	303
miR-372	<u>GUGGGCCUCAAAUGUGGAGCACUAUUCUGAUG</u> <u>UCCAAGUGGAAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU</u> <u>CAC</u>	304
miR-373	<u>GGGAUACUCAAAAUGGGGGCGCUUCCUUUUU</u> <u>GUCUGUACUGGGAAGUGCUUCGAUUUUGGGGU</u> <u>GUCCC</u>	305
miR-374	<u>UACAUCGGCAUUAUAUAACAACCUGAUAAGU</u> <u>GUUAUAGCACUUAUCAGAUUGUAUUGUAAUUG</u> <u>UCUGUGUA</u>	306
miR-hes1	<u>AUGGAGCUGCUCACCCUGUGGGCCUCAAAUGU</u> <u>GGAGGAACUAUUCUGAUGUCCAAGUGGAAAGU</u> <u>GCUGCGACAUUUGAGCGUCACCGGUGACGCC</u> <u>AUAUCA</u>	307

<i>miR-hes2</i>	GCAUCCCCUCAGCCUGUGGCACUCAAACUGUG GGGGCACUUUCUGCUCUCUGGGUGAAAGUGCCG CCAUCUUUUGAGUGUUACCGCUUGAGAAGACU CAACC	308
<i>miR-hes3</i>	CGAGGAGCUCAUACUGGGAUACUCAAAAUGGG GGCGCUUCCUUUUUGUCUGUACUGGGGAAGU GCUUCGAUUUUGGGGUGUCCCUGUUUGAGUAG GGCAUC	309

* Una secuencia subrayada en una secuencia precursora corresponde a una transcripción procesada en miR maduro (véase la Tabla 1b). Algunas secuencias tienen dos secuencias subrayadas que denotan dos miR maduros diferentes que se derivan del mismo precursor. Todas las secuencias son humanas.

Tabla 1b – Secuencias de microARN maduros humanos

Nombre del miARN Maduro	Secuencia de miARN Maduro (5' to 3')	SEC ID N°	Precursor de microARN(s) correspondiente véase la Tabla 1a
<i>let-7a</i>	ugagguaguagguuguauaguu	310	<i>let-7a-1; let-7a-2; let-7a-3; let-7a-4</i>
<i>let-7b</i>	ugagguaguagguugugugguu	311	<i>let-7b</i>
<i>let-7c</i>	ugagguaguagguuguauugguu	312	<i>let-7c</i>
<i>let-7d</i>	agagguaguagguugcauagu	313	<i>let-7d, let-7d-v1</i>
<i>let-7e</i>	ugagguaggagguuguauagu	314	<i>let-7e</i>
<i>let-7f</i>	ugagguaguagauuguauaguu	315	<i>let-7f-1; let-7f-2-1; let-7f-2-2</i>
<i>let-7g</i>	ugagguaguaguuuuguacagu	316	<i>let-7g</i>
<i>let-7i</i>	ugagguaguaguuuugugcu	317	<i>let-7i</i>
<i>miR-1</i>	uggaaguaaagaaguauagua	318	<i>miR-1b; miR-1b-1; miR-1b-2</i>
<i>miR-7</i>	uggaagacuagugauuuuguu	319	<i>miR-7-1; miR-7-1a; miR-7-2; miR-7-3</i>
<i>miR-9</i>	ucuuugguuauacuagcuguaug a	320	<i>miR-9-1; miR-9-2; miR-9-3</i>
<i>miR-9*</i>	uaaagcuagauaacggaaagu	321	<i>miR-9-1; miR-9-2; miR-9-3</i>
<i>miR-10a</i>	uaccuguagauccgaaauugug	322	<i>miR-10a</i>
<i>miR-10b</i>	uaccuguagaaccgaaauugu	323	<i>miR-10b</i>
<i>miR-15a</i>	uagcagcacauaaugguuugug	324	<i>miR-15a; miR-15a-2</i>
<i>miR-15b</i>	uagcagcacaucaugguuuaca	325	<i>miR-15b</i>
<i>miR-16</i>	uagcagcacguaaauauuggcg	326	<i>miR-16-1; miR-16-2; miR-16-13</i>
<i>miR-17-5p</i>	caaagugcuuacagugcagguag u	327	<i>miR-17</i>
<i>miR-17-3p</i>	acugcagugaaggcacuugu	328	<i>miR-17</i>
<i>miR-18</i>	uaaggugcaucuagugcagaua	329	<i>miR-18; miR-18-13</i>
<i>miR-19a</i>	ugugcaaaucuaugcaaaacuga	330	<i>miR-19a; miR-19a-13</i>
<i>miR-19b</i>	ugugcaaaucuaugcaaaacuga	331	<i>miR-19b-1; miR-19b-2</i>
<i>miR-20</i>	uaaagugcuuauagugcaggua	332	<i>miR-20 (miR-20a)</i>
<i>miR-21</i>	uagcuuauacagacugauugua	333	<i>miR-21; miR-21-17</i>
<i>miR-22</i>	aagcugccaguugaagaacugu	334	<i>miR-22</i>
<i>miR-23a</i>	aucacauugccagggaauucc	335	<i>miR-23a</i>
<i>miR-23b</i>	aucacauugccagggaauaccac	336	<i>miR-23b</i>
<i>miR-24</i>	uggcucaguuacagcaggaacag	337	<i>miR-24-1; miR-24-2; miR-24-19; miR-24-9</i>
<i>miR-25</i>	cauugcacuugucucggucuga	338	<i>miR-25</i>
<i>miR-26a</i>	uucaaguaauccaggauaggcu	339	<i>miR-26a; miR-26a-1; miR-26a-2</i>
<i>miR-26b</i>	uucaaguaauccaggauaggu	340	<i>miR-26b</i>
<i>miR-27a</i>	uucacagugcuuaguuccgcc	341	<i>miR-27a</i>
<i>miR-27b</i>	uucacagugcuuaguuucug	342	<i>miR-27b-1; miR-27b-2</i>
<i>miR-28</i>	aaggagcucacagucuauugag	343	<i>miR-28</i>
<i>miR-29a</i>	cuagcaccuacugaaucgguu	344	<i>miR-29a-2; miR-29a</i>

ES 2 524 018 T3

<i>miR-29b</i>	uagcaccuuugaaaucagu	345	<i>miR-29b-1; miR-29b-2</i>
<i>miR-29c</i>	uagcaccuuugaaaucgguua	346	<i>miR-29c</i>
<i>miR-30a-5p</i>	uguaaaacauccucgacuggaagc	347	<i>miR-30a</i>
<i>miR-30a-3p</i>	cuuucagucggauguuugcagc	348	<i>miR-30a</i>
<i>miR-30b</i>	uguaaaacauccuacacucagc	349	<i>miR-30b-1; miR-30b-2</i>
<i>miR-30c</i>	uguaaaacauccuacacucucagc	350	<i>miR-30c</i>
<i>miR-30d</i>	uguaaaacaucccccgcuggaag	351	<i>miR-30d</i>
<i>miR-30e</i>	uguaaaacauccuugacugga	352	<i>miR-30e</i>
<i>miR-31</i>	ggcaagaugcuggcauagcug	353	<i>miR-31</i>
<i>miR-32</i>	uauugcacauuacuaaguugc	354	<i>miR-32</i>
<i>miR-33</i>	gugcauuguaguugcauug	355	<i>miR-33; miR-33b</i>
<i>miR-34a</i>	uggcagugucuuagcugguugu	356	<i>miR-34a</i>
<i>miR-9</i>	ucuuugguuaucuagcuguaug a	320	<i>miR-9-1; miR-9-2; miR-9-3</i>
<i>miR-9*</i>	uaaagcuagauaacggaagu	321	<i>miR-9-1; miR-9-2; miR-9-3</i>
<i>miR-10a</i>	uaccuguagaucgaaauuugug	322	<i>miR-10a</i>
<i>miR-10b</i>	uaccuguagaaccgaaauuugu	323	<i>miR-10b</i>
<i>miR-15a</i>	uagcagcacauaaugguuugug	324	<i>miR-15a; miR-15a-2</i>
<i>miR-15b</i>	uagcagcacaucaugguuuaca	325	<i>miR-15b</i>
<i>miR-16</i>	uagcagcacguaaauauuggcg	326	<i>miR-16-1; miR-16-2; miR-16-13</i>
<i>miR-17-5p</i>	caaagugcuuacagucagguag u	327	<i>miR-17</i>
<i>miR-17-3p</i>	acugcagugaaggcacuugu	328	<i>miR-17</i>
<i>miR-18</i>	uaaggugcaucuaugcagaua	329	<i>miR-18; miR-18-13</i>
<i>miR-19a</i>	ugugcaaaucuaugcaaaacuga	330	<i>miR-19a; miR-19a-13</i>
<i>miR-19b</i>	ugugcaaaucuaugcaaaacuga	331	<i>miR-19b-1; miR-19b-2</i>
<i>miR-20</i>	uaaagugcuuauagucaggua	332	<i>miR-20 (miR-20a)</i>
<i>miR-21</i>	uagcuuauacagacugauguuga	333	<i>miR-21; miR-21-17</i>
<i>miR-22</i>	aagcugccaguugaagaacugu	334	<i>miR-22</i>
<i>miR-23a</i>	aucacauugccagggaauucc	335	<i>miR-23a</i>
<i>miR-23b</i>	aucacauugccagggaauaccac	336	<i>miR-23b</i>
<i>miR-24</i>	uggcucaguuacagcaggaacag	337	<i>miR-24-1; miR-24-2; miR-24-19; miR-24-9</i>
<i>miR-25</i>	cauugcacuuugucugucuga	338	<i>miR-25</i>
<i>miR-26a</i>	uucaaguaauccaggauaggcu	339	<i>miR-26a; miR-26a-1; miR-26a-2</i>
<i>miR-26b</i>	uucaaguaauucaggauaggu	340	<i>miR-26b</i>
<i>miR-27a</i>	uucacaguggcuaaguuccgcc	341	<i>miR-27a</i>
<i>miR-27b</i>	uucacaguggcuaaguucug	342	<i>miR-27b-1; miR-27b-2</i>
<i>miR-28</i>	aaggagcucacagucuaugag	343	<i>miR-28</i>
<i>miR-29a</i>	cuagcaccuugaaaucgguu	344	<i>miR-29a-2; miR-29a</i>
<i>miR-29b</i>	uagcaccuuugaaaucagu	345	<i>miR-29b-1; miR-29b-2</i>
<i>miR-29c</i>	uagcaccuuugaaaucgguua	346	<i>miR-29c</i>
<i>miR-30a-5p</i>	uguaaaacauccucgacuggaagc	347	<i>miR-30a</i>
<i>miR-30a-3p</i>	cuuucagucggauguuugcagc	348	<i>miR-30a</i>
<i>miR-30b</i>	uguaaaacauccuacacucagc	349	<i>miR-30b-1; miR-30b-2</i>
<i>miR-30c</i>	uguaaaacauccuacacucucagc	350	<i>miR-30c</i>
<i>miR-30d</i>	uguaaaacaucccccgcuggaag	351	<i>miR-30d</i>
<i>miR-30e</i>	uguaaaacauccuugacugga	352	<i>miR-30e</i>
<i>miR-31</i>	ggcaagaugcuggcauagcug	353	<i>miR-31</i>
<i>miR-32</i>	uauugcacauuacuaaguugc	354	<i>miR-32</i>
<i>miR-33</i>	gugcauuguaguugcauug	355	<i>miR-33; miR-33b</i>

ES 2 524 018 T3

<i>miR-34a</i>	uggcagugucuugcugguugu	356	<i>miR-34a</i>
<i>miR-139</i>	ucuacagugcagugucu	394	<i>miR-139</i>
<i>miR-140</i>	agugguuuuacccuagguag	395	<i>miR-140; miR-140as; miR-140s</i>
<i>miR-141</i>	aacacugucugguaaagaugg	396	<i>miR-141-1; miR-141-2</i>
<i>miR-142-3p</i>	uguaguguuuuccuacuuuugg a	397	<i>miR-142</i>
<i>miR-142-5p</i>	cauaaaguagaaagcacuac	398	<i>miR-142</i>
<i>miR-143</i>	ugagaugaagcacuguagcuca	399	<i>miR-143-1</i>
<i>miR-144</i>	uacaguauagaugauguacuag	400	<i>miR-144-1; miR-144-2</i>
<i>miR-145</i>	guccaguuuuccaggaaucccu u	401	<i>miR-145-1; miR-145-2</i>
<i>miR-146</i>	ugagaacugaaauccauggguu	402	<i>miR-146-1; miR-146-2</i>
<i>miR-147</i>	guguguggaaaugcuucugc	403	<i>miR-147</i>
<i>miR-148a</i>	ucagugcacuacagaacuuugu	404	<i>miR-148a (miR-148)</i>
<i>miR-148b</i>	ucagugcaucacagaacuuugu	405	<i>miR-148b</i>
<i>miR-149</i>	ucuggcuccgugucuucacucc	406	<i>miR-149</i>
<i>miR-150</i>	ucucccaacccuuguaccagug	407	<i>miR-150-1; miR-150-2</i>
<i>miR-151</i>	acuagacugaagcuccuugagg	408	<i>miR-151</i>
<i>miR-152</i>	ucagugcaugacagaacuugg	409	<i>miR-152-1; miR-152-2</i>
<i>miR-153</i>	uugcauagucacaaaaguga	410	<i>miR-153-1-1; miR-153-1-2; miR-153-2-1; miR-153-2-2</i>
<i>miR-154</i>	uagguuauccguguugccuucg	411	<i>miR-154-1; miR-154-2</i>
<i>miR-154*</i>	aaucacuacacggugaccuauu	412	<i>miR-154-1; miR-154-2</i>
<i>miR-155</i>	uuauugcuauucgugauagggg	413	<i>miR-155</i>
<i>miR-181a</i>	aacauucaacgcugucggugagu	414	<i>miR-181a</i>
<i>miR-181b</i>	aacauucauugcugucggugggu u	415	<i>miR-181b-1; miR-181b-2</i>
<i>miR-181c</i>	aacauucaaccugucggugagu	416	<i>miR-181c</i>
<i>miR-182</i>	uuugcgaugguagaacucaca	417	<i>miR-182; miR-182as</i>
<i>miR-182*</i>	ugguucuagacuugccaacua	418	<i>miR-182; miR-182as</i>
<i>miR-183</i>	uauggcacugguagaauucacug	419	<i>miR-183</i>
<i>miR-184</i>	uggacggagaacugauaaggggu	420	<i>miR-184-1; miR-184-2</i>
<i>miR-185</i>	uggagagaaaggcaguuc	421	<i>miR-185-1; miR-185-2</i>
<i>miR-186</i>	caaagaauucuccuuugggcuu	422	<i>miR-186-1; miR-186-2</i>
<i>miR-187</i>	ucgugucuuguguugcagccg	423	<i>miR-187</i>
<i>miR-188</i>	caucccuugcauggugggggu	424	<i>miR-188</i>
<i>miR-189</i>	gugccuacugagcugauaucagu	425	<i>miR-189-1; miR-189-2</i>
<i>miR-190</i>	ugauauguuugauauuuaggu	426	<i>miR-190-1; miR-190-2</i>
<i>miR-191</i>	caacggaaucccaaaagcagcu	427	<i>miR-191-1; miR-191-2</i>
<i>miR-192</i>	cugaccuauugaauugacagcc	428	<i>miR-192</i>
<i>miR-193</i>	aacuggccuacaaaguuccag	429	<i>miR-193-1; miR-193-2</i>
<i>miR-194</i>	uguaacagcaacuccaugugga	430	<i>miR-194-1; miR-194-2</i>
<i>miR-195</i>	uagcagcacagaaauauuggc	431	<i>miR-195-1; miR-195-2</i>
<i>miR-196a</i>	uagguaguuucauguuguugg	432	<i>miR-196a; miR-196a-2 (miR196-2)</i>
<i>miR-196b</i>	uagguaguuuuccuguuguugg	433	<i>miR-196b</i>
<i>miR-197</i>	uucaccaccuucuccaccagc	434	<i>miR-197</i>
<i>miR-198</i>	gguccagaggggagauagg	435	<i>miR-198</i>
<i>miR-199a</i>	cccaguguucagacuaccuguuc	436	<i>miR-199a-1; miR-199a-2</i>
<i>miR-199a*</i>	uacaguagucgcacauugguu	437	<i>miR-199a-1; miR-199a-2; miR-199s; miR-199b</i>
<i>miR-199b</i>	cccaguguuuagacuauccuguuc	438	<i>miR-199b</i>
<i>miR-200a</i>	uaacacugucugguacgaugu	439	<i>miR-200a</i>

ES 2 524 018 T3

<i>miR-200b</i>	cucuaaucugccugguauaugau g	440	<i>miR-200b</i>
<i>miR-200c</i>	aaucacugccggguauaugga	441	<i>miR-200c</i>
<i>miR-202</i>	agagguauagggaucuggaaga	442	<i>miR-202</i>
<i>miR-203</i>	gugaaauguuuaggaccacuag	443	<i>miR-203</i>
<i>miR-204</i>	uucccuuugucauccuauugccu	444	<i>miR-204</i>
<i>miR-205</i>	uccuucuuuccaccggagucug	445	<i>miR-205</i>
<i>miR-206</i>	uggaauuaaggaagugugugg	446	<i>miR-206-1; miR-206-2</i>
<i>miR-208</i>	auaagacgagcaaaaagcuugu	447	<i>miR-208</i>
<i>miR-210</i>	cugugcgugugacagcggcug	448	<i>miR-210</i>
<i>miR-211</i>	uucccuuugucauccuucgccu	449	<i>miR-211</i>
<i>miR-212</i>	uaacagucuccagucagggcc	450	<i>miR-212</i>
<i>miR-213</i>	accuagcaccguugauuguacc	451	<i>miR-213</i>
<i>miR-214</i>	acagcaggcacagacaggcag	452	<i>miR-214</i>
<i>miR-215</i>	augaccuauugaauugacagac	453	<i>miR-215</i>
<i>miR-216</i>	uaaucucagcuggcaacugug	454	<i>miR-216</i>
<i>miR-217</i>	uacugcaucaggaacugauugga u	455	<i>miR-217</i>
<i>miR-218</i>	uugugcuugaucaaccaugu	456	<i>miR-218-1; miR-218-2</i>
<i>miR-219</i>	ugauuguccaaacgcaauucu	457	<i>miR-219; miR-219-1; miR-219-2</i>
<i>miR-220</i>	ccacaccguaucugacacuuu	458	<i>miR-220</i>
<i>miR-221</i>	agcuacauugucugcuggguuuc	459	<i>miR-221</i>
<i>miR-222</i>	agcuacaucuggcuacugggucu c	460	<i>miR-222</i>
<i>miR-223</i>	ugucaguuugucaaaauacccc	461	<i>miR-223</i>
<i>miR-224</i>	caagucacuagugguuccguuuu	462	<i>miR-224</i>
<i>miR-296</i>	agggccccccucaaauccugu	463	<i>miR-296</i>
<i>miR-299</i>	ugguuuaccguccacauacau	464	<i>miR-299</i>
<i>miR-301</i>	cagugcaauaguauugucuaaagc	465	<i>miR-301</i>
<i>miR-302a</i>	uaagugcuuccauguuuuggug a	466	<i>miR-302a</i>
<i>miR-302b*</i>	acuuuaacauggaagucuuucu	467	<i>miR-302b</i>
<i>miR-302b</i>	uaagugcuuccauguuuaguag	468	<i>miR-302b</i>
<i>miR-302c*</i>	uuuaacauggggguaccugcug	469	<i>miR-302c</i>
<i>miR-302c</i>	uaagugcuuccauguuucagugg	470	<i>miR-302c</i>
<i>miR-302d</i>	uaagugcuuccauguuugagug u	471	<i>miR-302d</i>
<i>miR-320</i>	aaaagcuggguugagaggcgaa	472	<i>miR-320</i>
<i>miR-321</i>	uaagccagggaauugugguuc	473	<i>miR-321</i>
<i>miR-323</i>	gcacauuacacggucgaccucu	474	<i>miR-323</i>
<i>miR-324-5p</i>	cgcaucccuagggaauuggugu	475	<i>miR-324</i>
<i>miR-324-3p</i>	ccacugcccaggugcugcugg	476	<i>miR-324</i>
<i>miR-325</i>	ccuaguagguguccaguaagu	477	<i>miR-325</i>
<i>miR-326</i>	ccucugggcccuccuccag	478	<i>miR-326</i>
<i>miR-328</i>	cuggccucucugccuuccgu	479	<i>miR-328</i>
<i>miR-330</i>	gcaaagcacacggccugcagaga	480	<i>miR-330</i>
<i>miR-331</i>	gcccugggcccuauccuagaa	481	<i>miR-331</i>
<i>miR-335</i>	ucaagagcaauaacgaaaaugu	482	<i>miR-335</i>
<i>miR-337</i>	uccagcuccuauaugauccuuu	483	<i>miR-337</i>
<i>miR-338</i>	uccagcaucagugauuuuguuga	484	<i>miR-338</i>
<i>miR-339</i>	ucccuguccuccaggagcuca	485	<i>miR-339</i>
<i>miR-340</i>	uccgucucaguuacuuuauagcc	486	<i>miR-340</i>
<i>miR-342</i>	ucucacacagaaucgacccguc	487	<i>miR-342</i>

<i>miR-345</i>	ugcugacuccuaguccagggc	488	<i>miR-345</i>
<i>miR-346</i>	ugucugcccgaugccugccucu	489	<i>miR-346</i>
<i>miR-367</i>	aaaugcacuuuagcaauagguga	490	<i>miR-367</i>
<i>miR-368</i>	acauagaggaaauuccacguuu	491	<i>miR-368</i>
<i>miR-369</i>	aaauaacaugguugaucuuu	492	<i>miR-369</i>
<i>miR-370</i>	gccugcugggguggaaccugg	493	<i>miR-370</i>
<i>miR-371</i>	gugccgccaucuuuugagugu	494	<i>miR-371</i>
<i>miR-372</i>	aaagugcugcgacauuugagcgu	495	<i>miR-372</i>
<i>miR-373*</i>	acuaaaaugggggcgcuuucc	496	<i>miR-373</i>
<i>miR-373</i>	gaagugcuucgauuuuggggug u	497	<i>miR-373</i>
<i>miR-374</i>	uuauaaacaaccugauaagug	498	<i>miR-374</i>

El nivel de al menos un producto génico miR se puede medir en las células de una muestra biológica obtenida del sujeto. Por ejemplo, una muestra de tejido se puede retirar de un sujeto sospechoso de tener un cáncer pancreático por técnicas de biopsia convencionales. En otra realización, una muestra de sangre se puede retirar del sujeto y los glóbulos blancos se pueden aislar para la extracción de ADN por técnicas de referencia. La muestra de sangre o tejido se obtiene del sujeto preferentemente antes de iniciar la radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento terapéutico. Se puede obtener una muestra correspondiente de tejido o de sangre, o una muestra control de referencia, de tejidos sin afectar del sujeto, de un individuo humano normal o de una población de individuos normales, o de cultivos celulares que se corresponden con la mayoría de las células de la muestra del sujeto. La muestra de control de tejido o sangre se procesa entonces junto con la muestra del sujeto, de forma que se puedan comparar los niveles del producto génico miR producidos por un determinado gen miR en las células de la muestra del sujeto con los niveles del producto génico miR correspondiente en las células de la muestra de control. De manera alternativa, se puede obtener una muestra de referencia y procesarse por separado (por ejemplo, en un tiempo diferente) de una muestra de ensayo y el nivel de un producto génico miR producido a partir de un determinado gen miR en las células de la muestra de ensayo se puede comparar con el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de referencia.

En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control (es decir, la expresión del producto génico miR está "regulado positivamente"). Como se utiliza en el presente documento, la expresión de un producto génico miR está "regulado positivamente" cuando la cantidad de producto génico miR en una célula o muestra de tejido de un sujeto es mayor que la cantidad del mismo producto génico en una célula o muestra de tejido de control. En otra realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico correspondiente en la muestra de control (es decir, la expresión del producto génico miR está "regulado negativamente"). Como se utiliza en el presente documento, la expresión de un gen miR está "regulada negativamente" cuando la cantidad de producto génico miR producido de ese gen en una célula o muestra de tejido de un individuo es menor que la cantidad producida a partir del mismo gen en una célula de control o muestra de tejido. La expresión génica miR relativa en las muestras normal y de control se puede determinar con respecto a una o más referencias de expresión de ARN. Las referencias pueden comprender, por ejemplo, un nivel cero de expresión génica miR, el nivel de expresión génica miR en una línea celular de referencia, el nivel de expresión génica miR en tejidos no afectados del sujeto, o el nivel medio de la expresión génica miR obtenido previamente para una población de controles humanos normales.

Una alteración (es decir, un aumento, una disminución) del nivel de un producto génico miR en la muestra obtenida del sujeto, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de la presencia de un cáncer pancreático en el sujeto. En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del correspondiente producto génico miR en la muestra de control. Los productos génicos miR que tienen niveles de expresión mayores en el cáncer pancreático que en el tejido pancreático normal se describen en el presente documento (véase, por ejemplo, Ejemplificación). En una realización, el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-103-2, miR-107, miR-103-1, miR-342, miR-100, miR-24-2, miR-23a, miR-125a, miR-26a-1, miR-24-1, miR-191, miR-15a, miR-368, miR-26b, miR-125b-2, miR-125b-1, miR-26a-2, miR-335, miR-126, miR-1-2, miR-21, miR-25, miR-92-2, miR-130a, miR-93, miR-16-1, miR-145, miR-17, miR-99b, miR-181b-1, miR-146, miR-181b-2, miR-16-2, miR-99a, miR-197, miR-10a, miR-224, miR-92-1, miR-27a, miR-221, miR-320, miR-7-1, miR-29b-2, miR-150, miR-30d, miR-29a, miR-23b, miR-135a-2, miR-223, miR-3p21-v, miR-128b, miR-30b, miR-29b-1, miR-106b, miR-132, miR-214, miR-7-3, miR-29c, miR-367, miR-30c-2, miR-27b, miR-140, miR-10b, miR-20, miR-129-1, miR-340, miR-30a, miR-30c-1, miR-106a, miR-32, miR-95, miR-222, miR-30e, miR-129-2, miR-345, miR-143, miR-182, miR-1-1, miR-133a-1, miR-200c, miR-194-1, miR-210, miR-181c, miR-192, miR-220, miR-213, miR-323, miR-375 y una combinación de los mismos. En otra realización, el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-103, miR-107 y una combinación de los mismos. En otra realización más, el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-23a, miR-26b, miR-192, miR-342 y una combinación de los

mismos.

5 En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. Los productos génicos miR que tienen niveles de expresión más bajos en el cáncer pancreático que en el tejido pancreático normal se describen en el presente documento (véase, por ejemplo, Ejemplificación). En una realización el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-326, miR-155, miR-339, miR-34c, miR-345, miR-152, miR-372, miR-128a y una combinación de los mismos. En otra realización, el al menos un producto génico miR es el miR-155.

10 En una realización, el al menos un producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-103, miR-107, miR-155 y una combinación de los mismos. En otra realización, el al menos un producto génico miR es miR-103, que está regulado positivamente en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra de control. En otra realización más, el al menos un producto génico miR es miR-107, que está regulado positivamente en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra de control. En otra realización más, el al menos un producto
15 génico miR es miR-155, que está regulado negativamente en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra de control. En una realización particular, los tres de estos miR (miR-103, miR-107 y miR-155) se comparan con los miR correspondientes de la muestra de control. Como se describe y se ejemplifica en el presente documento, la expresión de *miR-103* y *miR-107*, asociada con la falta de expresión de miR-155, discrimina entre tumores pancreáticos y páncreas normal.

20 En una realización, el cáncer pancreático que se diagnostica es un tumor pancreático endocrino (PET). En otra realización, el cáncer pancreático que se diagnostica es un cáncer pancreático exocrino (por ejemplo, un adenocarcinoma). En otra realización más, el cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en un tumor pancreático endocrino (PET) y un tumor pancreático exocrino (por ejemplo, un adenocarcinoma). En una realización particular, el cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en un carcinoma celular acinar (PACC) y un insulinooma. En otra realización más, el cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona del grupo que consiste en tumor pancreático endocrino (PET), un carcinoma pancreático celular acinar (PACC) y un insulinooma. En otra realización más, el método de diagnóstico se
25 puede utilizar para diagnosticar cualquier tipo de cáncer pancreático.

30 Una realización de la divulgación es un método para diagnosticar si el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un carcinoma pancreático celular acinar (PACC). En este método, el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo del sujeto se compara con el nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) del nivel del producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de que el sujeto o tiene, o está en riesgo de desarrollar, PACC. En una realización el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización, el al menos un producto génico miR que está regulado positivamente se
35 selecciona de entre el grupo que consiste en miR-103-2, miR-25, miR-200c, miR-335, miR-21, miR-103-1, miR-92-1, miR-181b-2, miR-191, miR-93, miR-26a-1, miR-17, miR-20, miR-107, miR-26b, miR-215, miR-92-2, miR-192, miR-342, miR-100, miR-3p21-v, miR-106a, m1R-15a, miR-23a, miR-181b-1, miR-128b, miR-106b, miR-194-1, miR-219-1, miR-242 y una combinación de los mismos. En otra realización más, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización más, el al menos un producto génico miR que está regulado negativamente se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-218-2, miR-339, miR-326, miR-34c, miR-152, miR-138-2, miR-128a y una combinación de los mismos.

45 Una realización de la divulgación es un método para diagnosticar el tipo de cáncer pancreático que tiene un sujeto. En este método, el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo del sujeto se compara con el nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control. Una alteración (por ejemplo un aumento, una disminución) del nivel del producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa del tipo de cáncer pancreático.

50 En una realización particular, el tipo de cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en un tumor endocrino pancreático (PET) y un carcinoma pancreático celular acinar (PACC). En otra realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en una muestra de control. En otra realización, el tipo de cáncer pancreático es un tumor pancreático endocrino (PET) y el al menos un producto génico miR que está regulado positivamente se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-125a, miR-99a, miR-99b, miR-125b-1, miR-342, miR-130a, miR-100, miR-132, miR-129-2, miR-125b-2 y una combinación de los mismos. En otra realización más, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización más, el tipo de cáncer pancreático es un carcinoma pancreático celular acinar (PACC) y el al menos un producto génico miR que está regulado negativamente se
55 selecciona de entre el grupo que consiste en miR-125a, miR-99a, miR-99b, miR-125b-1, miR-342, miR-130a, miR-100, miR-132, miR-129-2, miR-125b-2 y una combinación de los mismos. Como se describe en el presente documento, la expresión de productos génicos miR particulares pueden distinguir entre PET y PACC (véase, por

ejemplo, la Ejemplificación).

5 En una realización, el tipo del cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en carcinoma endocrino bien diferenciado (WDEC) y un carcinoma pancreático celular acinar (PACC). En otra realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en una muestra de control. En otra realización más, el tipo de cáncer pancreático es un carcinoma endocrino bien diferenciado (WDEC) y el al menos un producto génico miR que está regulado positivamente se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-125a, miR-99a, miR-132 y una combinación de los mismos. En otra realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico miR en la muestra de control. En otra realización más, el tipo de cáncer pancreático es un carcinoma endocrino bien diferenciado (WDEC) y el al menos un producto génico miR que está regulado negativamente es miR-148a. Como se describe en el presente documento, la expresión de productos génicos miR particulares puede distinguir entre WEDC y PACC (véase, por ejemplo, Ejemplificación).

15 En una realización, el tipo de cáncer pancreático que se diagnostica se selecciona de entre el grupo que consiste en un insulinoma y un tumor pancreático endocrino no funcional (NF-PET). En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización el tipo de cáncer es un insulinoma y el al menos un producto génico miR que está regulado positivamente se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-204, miR-203, miR-211 y una combinación de los mismos. Como se describe en el presente documento, la expresión de productos génicos miR pueden distinguir entre WEDC y PACC (véase, por ejemplo, Ejemplificación).

25 La divulgación también proporciona métodos para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer pancreático. En este método, se mide el nivel de al menos un producto génico miR, que se asocia con un pronóstico en particular en el cáncer pancreático (por ejemplo, un pronóstico bueno o positivo, un pronóstico malo o adverso) en una muestra de ensayo del sujeto. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) del nivel del producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de que el sujeto tiene un cáncer pancreático con un pronóstico particular. En una realización, el producto génico miR se asocia con un pronóstico adverso (es decir, malo). Son ejemplos de un pronóstico adverso, pero sin limitarse a estos, baja tasa de supervivencia y progresión rápida de la enfermedad. En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en una muestra de control. En otra realización, el al menos un producto génico miR que está regulado positivamente, y que se mide, es miR-21. En otra realización más, el cáncer pancreático se asocia con metástasis y/o un índice alto de proliferación. Como se describe en el presente documento, la expresión de productos génicos miR particulares, que se asocian con pronóstico adverso en cáncer pancreático, puede pronosticar la gravedad del cáncer pancreático de un sujeto (véase, por ejemplo, Ejemplificación). En ciertas realizaciones, el nivel del al menos un producto génico miR se mide por transcripción inversa de ARN a partir de una muestra de ensayo obtenida de un sujeto para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana, hibridando los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y comparando el perfil de hibridación de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control.

45 En una realización, la invención es un método para determinar si un cáncer pancreático de un sujeto es metastático. Como se describe en el presente documento, la mayoría de las muertes relacionadas con PET están causadas por metástasis hepáticas. Por lo tanto, la identificación del cáncer de páncreas metastático puede ayudar para determinar las opciones de tratamiento apropiadas. En este método, se mide el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de cáncer pancreático) de un sujeto. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) del nivel del producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR en una muestra de control, es indicativa de metástasis. En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización, el al menos un producto génico miR que está regulado positivamente es miR-21.

55 Una realización de la divulgación es un método para determinar si un cáncer pancreático de un sujeto tiene un índice alto de proliferación. Como es sabido, los cánceres pancreáticos que tienen un índice alto de proliferación tiene un pronóstico adverso y, por lo tanto, la identificación de cánceres pancreáticos que tienen un índice alto de proliferación también puede ayudar en la determinación de las opciones de tratamiento apropiadas. En este método, se mide el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo (por ejemplo una muestra de cáncer pancreático) de un sujeto. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) del nivel del producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de un índice alto de proliferación. En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en una muestra de control. En una realización, el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en la muestra de control. En otra realización, el al menos un producto génico miR que está regulado positivamente es miR-21.

La identificación de dianas de productos génicos miR particulares (por ejemplo, aquellos productos génicos que muestran una expresión regulada positivamente o regulada negativamente con respecto a una muestra de control) puede ayudar a esclarecer los mecanismos de acción de los microARN. Como se ejemplifica en el presente documento, se identificaron presuntas dianas particulares de microARN seleccionados, a saber *miR-103/miR-107*, *miR-155*, *miR-204/miR-211* y *miR-21*. Los análisis revelaron numerosos genes diana regulados positivamente (28 genes diana) y regulados negativamente (7 genes diana) de microARN particulares en muestras de cáncer pancreático. Como se describe en la tabla 10 se identificaron 28 genes diana regulados positivamente y 7 genes diana regulados negativamente de *miR-103/miR-107* en muestras de cáncer pancreático (Ejemplificación y Tabla 10). Además se identificaron 2 genes diana regulados positivamente y 2 genes diana regulados negativamente de *miR-103/miR-107*, y 1 gen diana regulado positivamente y 1 gen diana regulado negativamente de *miR-21* en muestras de cáncer pancreático (Ejemplificación y Tabla 10). Por lo tanto, en una realización, se puede utilizar la expresión de genes diana de microARN particulares (por ejemplo, los que se enumeran en la Tabla 10) para diagnosticar el cáncer (por ejemplo, el cáncer pancreático). Un experto en la técnica puede medir los niveles de expresión de cualquiera de estos genes diana utilizando métodos conocidos y/o métodos descritos en el presente documento para la medición de los niveles de expresión de microARN (por ejemplo, RT-PCR semicuantitativa o cuantitativa, análisis de transferencia de Northern, detección de hibridación en solución, análisis de micromatrices), sin una experimentación innecesaria. En una realización, el gen diana que se mide es el de muerte celular programada 4 (PDCD4).

Se desvela en el presente documento un método para determinar el pronóstico de un sujeto con un cáncer pancreático. En este método se mide el nivel de PDCD4 en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de cáncer pancreático) de un sujeto. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) del nivel de PDCD4 en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de PDCD4 en una muestra de control, es indicativa de un pronóstico adverso. En una realización, el nivel de PDCD4 en la muestra de ensayo es menor que el nivel de PDCD4 en la muestra de control. En otra realización, el cáncer pancreático se asocia con metástasis y/o índice alto de proliferación.

El nivel del al menos un producto génico miR se puede medir utilizando varias técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, análisis de transferencia de Northern, detección de hibridación en solución). En una realización particular, el nivel de al menos un producto génico miR se mide por transcripción inversa de ARN a partir de una muestra de ensayo obtenida de un sujeto para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana, hibridando los oligodesoxinucleótidos diana con uno o más oligonucleótidos sonda específicos de miARN (por ejemplo, una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN) para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y comparando el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de la muestra de control. Una alteración de la señal de al menos un miARN en la muestra de ensayo con respecto a la muestra de control es indicativa de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer pancreático. En una realización, la señal de al menos un miARN está regulada positivamente, con respecto a la señal generada a partir de la muestra de control. En otra realización, la señal de al menos un miARN está regulada negativamente con respecto a la señal generada a partir de una muestra de control. En una realización en particular, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para una parte sustancial de todos los miARN humanos conocidos. En una realización más, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más de los miARN que se seleccionan de entre el grupo que consiste en miR 103-2, miR-107, miR-103-1, miR-342, miRs-100, miR-24-2, miR-23a, miR-125a, miR-26a-1, miR-24-1, miR-191, miR-15a, miR-368, miR-26b, miR-125b-2, miR-125b-1, miR-26a-2, miR-335, miR-126, miR-1-2, miR-21, miR-25, miR-92-2, miR-130a, miR-93, miR-16-1, miR-145, miR-17, miR-99b, miR-181b-1, miR-146, miR-181b-2, miR-16-2, miR-99a, miR-197, miR-10a, miR-224, miR-92-1, miR-27a, miR-221, miR-320, miR-7-1, miR-29b-2, miR-150, miR-30d, miR-29a, miR-23b, miR-135a-2, miR-223, miR-3p21-v, miR-128b, miR-30b, miR-29b-1, miR-106b, miR-132, miR-214, miR-7-3, miR-29c, miR-367, miR-30c-2, miR-27b, miR-140, miR-10b, miR-20, miR-129-1, miR-340, miR-30a, miR-30c-1, miR-106a, miR-32, miR-95, miR-222, miR-30e, miR-129-2, miR-345, miR-143, miR-182, miR-1-1, miR-133a-1, miR-200c, miR-194-1, miR-210, miR-181c, miR-192, miR-220, miR-213, miR-323, miR-375, miR-326, miR-155, miR-339, miR-34c, miR-345, miR-152, miR-372, miR-128 a y una combinación de los mismos.

La micromatriz se puede preparar a partir de oligonucleótidos sonda específicos de un gen de secuencias conocidas de miARN. La matriz puede contener dos sondas de oligonucleótido diferentes para cada miARN, una que contiene la secuencia madura activa y la otra que es específica para el precursor del miARN. La matriz también puede contener controles, tales como una o más secuencias de ratón que se diferencian de las ortólogas humanas por unas pocas bases solo, que pueden servir como controles para las condiciones de rigurosidad de hibridación. También se pueden imprimir en los microchip ARNt y otros ARN (por ejemplo, ARNr, ARNm) de ambas especies, proporcionando un control positivo interno de hibridación específica, relativamente estable. También se pueden incluir uno o más controles apropiados de la hibridación no específica en el microchip. Con este fin, las secuencias se seleccionan basándose en la ausencia de cualquier homología con cualquier miARN conocido.

La micromatriz se puede fabricar utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos sonda de una longitud adecuada, por ejemplo, 40 nucleótidos, se modifican en amina 5' en la posición C6 y se imprimen utilizando sistemas de micromatrices disponibles comercialmente, por ejemplo, el Gene Machine OmniGrid™ 100 Microarrayer y los portaobjetos activados Amersham CodeLink™. Se prepara el oligómero de ADNc marcado correspondiente con los ARN diana por transcripción inversa del ARN diana con el cebador marcado. Después de la síntesis de la primera cadena, los híbridos ARN/ADN se desnaturalizan para degradar las matrices ARN. Los ADNc diana marcados preparados de esta manera se hibridan entonces al chip de micromatriz bajo condiciones de hibridación, por ejemplo, 6x SSPE / 30 % de formamida a 25 °C durante 18 horas, seguido por lavado en 0,75 x TNT a 37 °C durante 40 minutos. Se produce la hibridación en las posiciones de la matriz donde la sonda de ADN inmovilizado reconoce una diana complementaria de ADNc de la muestra. El ADNc diana marcado marca la posición exacta en la matriz donde se produce la unión, permitiendo una detección y cuantificación automáticas. El resultado consiste en una lista de acontecimientos de hibridación, que indican la abundancia relativa de secuencias específicas del ADNc, y por lo tanto la abundancia relativa de los correspondientes miR complementarios, en la muestra del paciente. De acuerdo con una realización, el oligómero de ADNc marcado es un ADNc marcado con biotina, preparado a partir de un cebador marcado con biotina. La micromatriz se procesa entonces por detección directa de las transcripciones que contienen biotina utilizando, por ejemplo, el conjugado estreptavidin-Alexa647, y se seleccionan utilizando métodos de selección convencionales. Las intensidades de la imagen de cada mancha en la matriz son proporcionales a la abundancia del miR correspondiente en la muestra del paciente.

El uso de la matriz tiene varias ventajas para la detección de la expresión de miARN. Primero, se puede identificar la expresión global de varios cientos de genes en la misma muestra al mismo tiempo. Segundo, por medio de un diseño cuidadoso de los oligonucleótidos sonda, se pueden identificar moléculas tanto precursoras como maduras. Tercero, en comparación con el análisis de transferencia de Northern, el chip necesita una pequeña cantidad de ARN, y proporciona resultados reproducibles utilizando 2,5 µg de ARN total. El número relativamente limitado de miARN (unos cientos por especie) permite la construcción de una micromatriz común para varias especies, con distintos oligonucleótidos sonda para cada uno. Tal herramienta permitiría el análisis de expresión trans-especie para cada miR conocido bajo varias condiciones.

Además del uso de ensayos cuantitativos del nivel de expresión de miR específicos, se puede emplear un microchip que contenga oligonucleótidos sonda específicos de miARN correspondientes a una parte sustancial del miRNoma, preferentemente el miRNoma completo, para llevar a cabo el perfil de la expresión génica de miR, para los análisis de patrones de expresión miR. Se pueden asociar distintas firmas miR con marcadores de enfermedad establecidos, o directamente con el estado de enfermedad.

De acuerdo con los métodos de perfil de la expresión, el ARN total de una muestra de un sujeto sospechoso de tener un cáncer (por ejemplo, un cáncer pancreático) se transcribe inversamente cualitativamente para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana marcados complementario al ARN de la muestra. Los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan entonces con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación de la muestra. El resultado es un perfil de hibridación para la muestra que representa el patrón de expresión de miARN en la muestra. El perfil de hibridación comprende la señal de la unión de oligodesoxinucleótidos de la muestra a los oligonucleótidos sonda específicos de miARN en la micromatriz. El perfil se puede registrar como la presencia o ausencia de unión (señal frente a cero señal). Más preferentemente, el perfil registrado incluye la intensidad de la señal de cada hibridación. El perfil se compara con el perfil de hibridación generado de una muestra de control normal, por ejemplo, no cancerosa. Una alteración en la señal es indicativa de la presencia de, o la propensión a desarrollar, un cáncer en el sujeto.

Otras técnicas para medir la expresión génica miR también están en la experiencia de la técnica, e incluyen varias técnicas para medir tasas de transcripción de ARN y degradación.

Se desvelan en el presente documento métodos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar un cáncer pancreático con pronóstico adverso. En este método, se mide el nivel de al menos un producto génico miR, que se asocia con un pronóstico adverso en el cáncer pancreático, por transcripción inversa de ARN a partir de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana. Los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan entonces con uno o más oligonucleótidos sonda específicos de miARN (por ejemplo, una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN) para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y el perfil de hibridación de la muestra de ensayo se compara con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control. Una alteración de la señal de al menos un miARN en la muestra de ensayo con respecto a la muestra control es indicativa de que el sujeto o tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer pancreático con un pronóstico adverso. En una realización, una alteración en la señal de miR-21 es indicativa de que el sujeto o tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer pancreático con pronóstico adverso.

En realizaciones particulares del diagnóstico, pronóstico y métodos terapéuticos desvelado en el presente documento, el producto génico miR no es uno o más de let7a -2, let-7c, let-7g, let-7i, miR-7-2, miR-7-3, miR-9, miR-9-1, miR-10a, miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-24-1, miR-24-2, miR-25, miR-29b-2, miR-30, miR-30a-5p, miR-30c, miR-30d, miR-31, miR-32, miR-34, miR-34a, miR-34a prec, miR-34a-1,

miR-34a-2, miR-92-2, miR-96, miR-99a, miR-99b prec, miR-100, miR-103, miR-106a, miR-107, miR-123, miR-124a-1, miR-125b-1, miR-125b-2, miR-126*, miR-127, miR-128b, miR-129, miR-129-1/2 prec, miR-132, miR-135-1, miR-136, miR-137, miR-141, miR-142-as, miR-143, miR-146, miR-148, miR-149, miR-153, miR-155, miR-159-1, miR-181, miR-181b-1, miR-182, miR-186, miR-191, miR-192, miR-195, miR-196-1, miR-196-1 prec, miR-196-2, miR-199a-1, miR-199a-2, miR-199b, miR-200b, miR-202, miR-203, miR-204, miR-205, miR-210, miR-211, miR-212, miR-214, miR-215, miR-217, miR-221 y/o miR-223.

Como se describe en el presente documento, el nivel de un producto génico miR en una muestra se puede medir utilizando cualquier técnica que sea adecuada para detectar niveles de expresión de ARN en una muestra biológica. Las técnicas adecuadas (por ejemplo, análisis de transferencia de Northern, RT-PCR, hibridación in situ) para determinar los niveles de expresión de ARN en una muestra biológica (por ejemplo, células, tejidos) las conocen bien los expertos en la técnica. En una realización particular, se detecta el nivel de al menos un producto génico miR utilizando el análisis de transferencia de Northern. Por ejemplo, se puede purificar el ARN celular total de las células por homogenización en presencia de un tampón de extracción de ácido nucleico, seguida por centrifugación. Los ácidos nucleicos se precipitan, y se retira el ADN por tratamiento con DNasa y precipitación. Las moléculas de ARN se separan entonces por electroforesis en gel sobre geles de agarosa de acuerdo con las técnicas de referencia, y se transfieren a filtros de nitrocelulosa. Se inmoviliza entonces el ARN en los filtros por calor. La detección y cuantificación de ARN específico se puede conseguir utilizando sondas ADN o ARN marcadas apropiadamente complementarias al ARN en cuestión. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook y col., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 7.

Las sondas adecuadas (por ejemplo, sondas ADN, sondas ARN) para la hibridación con transferencia de Northern de un producto génico miR determinado se pueden producir a partir de las secuencias de ácido nucleico que se dan en la Tabla 1a y Tabla 1b e incluyen, pero no se limitan a estas, sondas que tienen una complementariedad de al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % con el producto génico miR de interés, así como sondas que tienen una complementariedad completa con un producto génico de interés. Los métodos para la preparación de sondas ADN y sondas ARN marcadas, y las condiciones para la hibridación de las mismas para dirigirse a secuencias de nucleótido se describen en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook y col., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulos 10 y 11.

Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico se puede marcar, por ejemplo, con un radionúclido, tal como ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C , o ^{35}S ; un metal pesado; un ligando capaz de funcionar como un miembro de una pareja de unión específica a un ligando marcado (por ejemplo, biotina, avidina, o un anticuerpo); una molécula fluorescente, una molécula quimiofluorescente; una enzima o similares.

Las sondas se pueden marcar para una actividad específica alta sea por el método de traducción nick de Rigby y col. (1977), *J. Mol. Biol.* 113:237-251 o por el método de cebador aleatorio de Fienberg y col. (1983), *Anal. Biochem.* 132:6-13. Este último es el método de elección para sintetizar sondas marcadas con ^{32}P de alta actividad específica a partir de ADN monocatenario o a partir de matrices de ARN. Por ejemplo, reemplazando nucleótidos preexistentes por nucleótidos altamente radioactivos según el método de traducción nick, es posible preparar sondas de ácido nucleico marcadas ^{32}P con una actividad específica muy en exceso de 10^8 cpm/microgramo. Entonces, se puede llevar a cabo la detección autorradiográfica de la hibridación exponiendo los filtros hibridados a una película fotográfica. La exploración densitométrica de las películas fotográficas expuestas por los filtros hibridados proporciona una medición precisa de los niveles de transcripción génica miR. Utilizando otra estrategia, los niveles de transcripción génica miR se pueden cuantificar por sistemas de imagen computarizadas, tales como el Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager disponible en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

Cuando las sondas ADN o ARN marcadas con radionúclidos no son prácticas, se puede utilizar el método de cebador aleatorio para incorporar un análogo, por ejemplo el análogo dTTP 5-(N-(N-biotinil-epsilon-aminocaproil)-3-aminoalil) desoxiuridina trifosfato, en la moléculas sonda. El oligonucleótido sonda biotinilado se puede detectar por reacción con proteínas de unión a la biotina, tales como avidina, estreptavidina y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-biotina) acoplados a colorantes fluorescentes o enzimas que producen reacciones de color.

Además de Northern y otras técnicas de hibridación, se puede conseguir la determinación de los niveles de transcripciones ARN utilizando la técnica de hibridación in situ. Esta técnica necesita menos células que la técnica de transferencia de Northern e implica depositar células enteras en un cubreobjetos de microscopio y sondear el contenido de ácido nucleico de la célula con una solución que contiene sondas de ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ARN) radioactivo o marcado de otra manera. Esta técnica es particularmente adecuada para analizar muestras de biopsia de tejidos. La práctica de la técnica de hibridación in situ se describe con más detalles en la Patente de EE. UU. N° 5.427.916. Se pueden producir sondas adecuadas para la hibridación in situ de un producto génico miR determinado a partir de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en la Tabla 1a y la Tabla 1b, e incluyen, pero sin limitarse a estos, sondas que tienen una complementariedad de al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % con el producto génico de interés, así como sondas que tienen una complementariedad completa con un producto génico miR de interés, como se ha descrito anteriormente.

El número relativo de transcripciones génicas miR en células se puede determinar también por transcripción inversa de las transcripciones inversas miR, seguida por amplificación de las transcripciones inversas transcritas por una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los niveles de las transcripciones génicas miR se pueden cuantificar en comparación con una referencia interna, por ejemplo, el nivel de ARNm de un gen “constitutivo” presente en la misma muestra. Un gen “constitutivo” adecuado para su uso como una referencia interna incluye, por ejemplo, miosina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los métodos para llevar a cabo la RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, y las variaciones de la misma, son bien conocidas por un experto en la técnica.

En algunos casos, puede ser deseable determinar simultáneamente el nivel de expresión de una pluralidad de diferentes productos génicos miR en una muestra. En otros casos, puede ser deseable determinar el nivel de expresión de las transcripciones de todos los genes miR conocidos que se correlacionan con un cáncer (por ejemplo un cáncer pancreático). La evaluación de los niveles de expresión específica del cáncer para cientos de genes o productos génicos consume mucho tiempo y necesita una gran cantidad de ARN total (por ejemplo, al menos 20 µg para cada transferencia de Northern) y técnicas autorradiográficas que necesitan isótopos radioactivos.

Para superar estas limitaciones, se puede construir una oligobiblioteca, en formato microchip (es decir, una micromatriz) que contenga un grupo de oligonucleótidos sonda (por ejemplo, oligodesoxinucleótidos) que sean específicos de un grupo de genes miR. Utilizando tal micromatriz, se puede determinar el nivel de expresión de múltiples microARN en una muestra biológica transcribiendo inversamente los ARN para generar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana, e hibridarlos para sondear oligonucleótidos en la micromatriz para generar un perfil de hibridación, o expresión. El perfil de hibridación de la muestra de ensayo se puede entonces comparar con el de una muestra de control para determinar los microARN que tienen una alteración del nivel de expresión en células del cáncer pancreático. Como se utiliza en el presente documento, “oligonucleótido sonda” o “sonda de oligodesoxinucleótido” se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con un oligonucleótido diana. “Oligonucleótido diana” u “oligodesoxinucleótido diana” se refiere a una molécula que se va a detectar (por ejemplo, por medio de hibridación). Por “oligonucleótido sonda específico de miR” o “oligonucleótido sonda específico para un miR” quiere decirse un oligonucleótido sonda que tiene una secuencia seleccionada para hibridarse con un producto génico miR específico, o a una transcripción inversa del producto génico específico miR.

Un “perfil de expresión” o “perfil de hibridación” de una muestra en particular es esencialmente una huella dactilar del estado de la muestra; como dos estados pueden tener cualquier gen particular expresado de manera similar, la evaluación de un número de genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión génica que es único para el estado de la célula. Es decir, se puede distinguir entre tejido normal y tejido del cáncer pancreático, y en el tejido del cáncer pancreático, se pueden determinar diferentes estados de pronóstico (por ejemplo, perspectivas de supervivencia a largo plazo buenas o malas). Comparando los perfiles de expresión de tejido de cáncer pancreático en diferentes estados, se obtiene la información con respecto a cuales genes son importantes (incluyendo tanto la regulación positiva como la regulación negativa de los genes) en cada uno de los estados. La identificación de secuencias que se expresan diferencialmente en el tejido de cáncer pancreático o en tejido pancreático normal, así como la expresión diferencial resultante en diferentes resultados pronósticos, permite el uso de esta información de varias maneras. Por ejemplo, se puede evaluar un régimen particular de tratamiento (por ejemplo, para determinar si un fármaco quimioterápico actúa para mejorar el pronóstico a largo plazo en un paciente en particular). De manera similar, se puede hacer el diagnóstico o confirmarlo comparando muestras del paciente con perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión génica (o genes individuales) permiten seleccionar fármacos candidatos que supriman el perfil de expresión del cáncer pancreático o convertir un perfil de pronóstico malo en un perfil de pronóstico bueno.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, se cree que las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos miR en las células puede dar como resultado la mala regulación de una o más de las dianas pretendidas para esos miR, lo que daría lugar a la formación del cáncer pancreático. Por lo tanto, la alteración del nivel del producto génico miR (por ejemplo, disminuyendo el nivel de un miR que está regulado positivamente en las células del cáncer pancreático, aumentando el nivel de un miR que está regulado negativamente en las células del cáncer pancreático) puede tratar con éxito el cáncer pancreático.

En consecuencia, se desvelan en el presente documento métodos de tratamiento de un cáncer pancreático en un sujeto, en el que al menos un producto génico miR está mal regulado (por ejemplo, regulado negativamente, regulado positivamente) en las células (por ejemplo, células del cáncer pancreático) del sujeto. En una realización, el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo (por ejemplo una muestra de cáncer pancreático) es mayor que el nivel del producto génico miR correspondiente en una muestra de control. En otra realización, el nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo (por ejemplo una muestra de cáncer pancreático) es menor que el nivel del producto génico miR correspondiente en una muestra de control. Cuando el al menos un producto génico miR aislado está regulado negativamente en las células del cáncer pancreático, el método comprende la administración de una cantidad eficaz del al menos un producto génico miR aislado, o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo, tal que se inhiba la proliferación de las células cancerosas en el sujeto. Por ejemplo, cuando un producto génico miR está regulado negativamente en una célula cancerosa en un sujeto, la administración de una cantidad eficaz de un producto génico miR aislado al sujeto puede inhibir la proliferación de la célula cancerosa. El producto génico miR aislado que se administra al

- 5 sujeto puede ser idéntico a un producto génico miR de tipo silvestre endógeno (por ejemplo, un producto génico miR que se muestra en la Tabla 1a o la Tabla 1b) que está regulado negativamente en la célula cancerosa o puede ser una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo. Como se define en el presente documento, una "variante" de un producto génico miR se refiere a un miARN que tiene menos del 100 % de identidad con un
- 10 producto génico miR de tipo silvestre correspondiente y posee una o más actividades biológicas del correspondiente producto génico miR de tipo silvestre. Ejemplos de tales actividades biológicas incluyen, pero no se limitan a estas, la inhibición de la expresión de una molécula ARN diana (por ejemplo, inhibiendo la traducción de una molécula de ARN diana, modulando la estabilidad de una molécula ARN diana, inhibiendo el procesamiento de una molécula de ARN diana) e inhibición de un proceso celular asociado con un cáncer pancreático (por ejemplo, diferenciación celular, crecimiento celular, muerte celular). Estas variantes incluyen especies variantes y variantes que son consecuencia de una o más mutaciones (por ejemplo, una sustitución, una eliminación, una inserción) en un gen miR. En ciertas realizaciones, la variante es idéntica en al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % a un producto génico miR de tipo silvestre correspondiente.
- 15 Como se define en el presente documento, un "fragmento biológicamente activo" de un producto génico miR se refiere a un fragmento de ARN de un producto génico miR que posee una o más actividades biológicas de un producto génico miR tipo silvestre correspondiente. Como se ha descrito anteriormente, los ejemplos de tales actividades biológicas incluyen, pero no se limitan a estas, inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana e inhibición de un proceso celular asociado con el cáncer pancreático. En ciertas realizaciones, el fragmento biológicamente activo es al menos de aproximadamente 5, 7, 10, 12, 15, o 17 nucleótidos de longitud. En una realización particular, se puede administrar un producto génico miR aislado en combinación con uno o más tratamientos anti-cáncer adicionales. Los tratamientos anti-cáncer adecuados incluyen, pero no se limitan a estos, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de las mismas (por ejemplo quimiorradiación)
- 20 Cuando el al menos un producto génico miR aislado está regulado positivamente en las células cancerosas, los métodos comprenden la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la expresión del al menos un producto génico miR, tal que se inhiba la proliferación de las células del cáncer pancreático. Tales compuestos se denominan en el presente documento compuestos de inhibición de la expresión génica de miR. Ejemplos de compuestos adecuados de inhibición de la expresión génica de miR incluyen, pero no se limitan a estos, lo que se describen en el presente documento (por ejemplo, ARN bicatenario, ácidos nucleicos antisentido y moléculas de ARN enzimático). En una realización particular, un compuesto de inhibición de la expresión génica miR se puede administrar a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos anti-cáncer adicionales. Los tratamientos anti-cáncer adecuados incluyen, pero no se limitan a estos, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de los mismos (por ejemplo, quimiorradiación).
- 25 En una cierta realización, el producto génico miR aislado que está mal regulado en el cáncer pancreático (y que se administra al sujeto) se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-326, miR-155, miR-339, miR-34c, miR-345, miR-152, miR-372, miR-128a y una combinación de los mismos (o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo de uno o más de estos miR). En una realización particular, el producto génico miR que se
- 30 administra no es uno o más de let7a-2, let-7c, let-7g, let-7i, miR-7-2, miR-7-3, miR-9, miR-9-1, miR-10a, miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-24-1, miR-24-2, miR-25, miR-29b-2, miR-30, miR-30a-5p, miR-30c, miR-30d, miR-31, miR-32, miR-34, miR-34a, miR-34a prec, miR-34a-1, miR-34a-2, miR-92-2, miR-96, miR-99a, miR-99b prec, miR-100, miR-103, miR-106a, miR-107, miR-123, miR-124a-1, miR-125b-1, miR-125b-2, miRs-126*, miR-127, miR-128b, miR-129, miR-129-1/2 prec, miR-132, miR-135-1, miR-136, miR-137, miR-141, miR-142-as, miR-143, miR-146, miR-148, miR-149, miR-153, miR-155, miR 159-1, miRs-181, miR-181b-1, miR-182, miR-186, miR-191, miR-192, miR-195, miR-196-1, miR-196-1 prec, miR-196-2, miR-199a-1, miR-199a-2, miR-199b, miR-200b, miR-202, miR-203, miR-204, miR-205, miR-210, miR-211, miR-212, miR-214, miR-215, miR-217, miR-221 y/o miR-223.
- 35 Como se describe en el presente documento, cuando el al menos un producto génico miR asilado está regulado positivamente en las células cancerosas, el método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico miR, tal que se inhiba la proliferación de las células del cáncer pancreático. En una realización el compuesto para la inhibición de la expresión del al menos un producto génico miR inhibe un producto génico miR seleccionado de entre el grupo que
- 40 consiste en miR-103-2, miR-107, miR-103-1, miR-342, miR-100, miR-24-2, miR-23a, miR-125a, miR-26a-1, miR-24-1, miR-191, miR-15a, miR-368, miR-26b, miR-125b-2, miR-125b-1, miR-26a-2, miR-335, miR-126, miR-1-2, miR-21, miR-25, miR-92-2, miR-130a, miR-93, miR-16-1, miR-145, miR-17, miR-99b, miR-181b-1, miR-146, miR-181b-2, miR-16-2, miR-99a, miR-197, miR-10a, miR-224, miR-92-1, miR-27a, miR-221, miR-320, miR-7-1, miR-29b-2, miR-150, miR-30d, miR-29a, miR-23b, miR-135a-2, miR-223, miR-3p21-v, miR-128b, miR-30b, miR-29b-1, miR-106b,
- 45 miR-132, miR-214, miR-7-3, miR-29c, miR-367, miR-30c-2, miR-27b, miR-140, miR-10b, miR-20, miR-129-1, miR-340, miR-30a, miR-30c-1, miR-106a, miR-32, miR-95, miR-222, miR-30e, miR-129-2, miR-345, miR-143, miR-182, miR-1-1, miR-133a-1, miR-200c, miR-194-1, miR-210, miR-181c, miR-192, miR-220, miR-213, miR-323, miR-375 y una combinación de los mismos.
- 50 En una realización relacionada, los métodos de tratamiento del cáncer pancreático en un sujeto comprenden adicionalmente la etapa de determinar primero la cantidad de al menos un producto génico miR en las células
- 55
- 60
- 65

cancerosas del sujeto, y la comparación del nivel del producto génico miR con el nivel de un producto génico miR correspondiente en células de control. Si la expresión del producto génico miR está mal regulado (por ejemplo regulado positivamente, regulado negativamente) en las células del cáncer pancreático, los métodos comprenden además la alteración de la cantidad del al menos un producto génico miR que se expresa en las células del cáncer pancreático. En una realización, la cantidad del producto génico miR que se expresa en las células cancerosas es menor que la cantidad de producto génico miR que se expresa en las células de control, y se administra al sujeto una cantidad eficaz del producto génico miR, o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo. En otra realización, la cantidad del producto génico miR que se expresa en las células cancerosas es mayor que la cantidad del producto génico miR que se expresa en las células de control, y se administra al sujeto, una cantidad eficaz de al menos un compuesto para la inhibición de la expresión del al menos un gen miR. Los miR y los compuestos adecuados que inhiben la expresión de genes miR incluyen, por ejemplo, lo que se describen en el presente documento.

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

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

Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico miR se puede basar en el peso aproximado de la masa tumoral que va a tratarse. El peso aproximado de una masa tumoral se puede determinar calculando el volumen aproximado de la masa, en donde un centímetro cúbico de volumen es más o menos equivalente a un gramo. Una cantidad eficaz del producto génico 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 ciertas reivindicaciones, la masa tumoral puede ser de al menos aproximadamente 10 microgramo/gramo de masa tumoral, al menos aproximadamente 60 microgramos/gramo de masa tumoral o al menos aproximadamente 100 microgramos/gramo de masa tumoral.

Una cantidad eficaz de un producto génico miR aislado también se puede basar en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto que se va a tratar. Preferentemente, tales cantidades eficaces se administran por vía parenteral o enteral, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz del producto génico miR aislado que se administra a un sujeto puede variar desde aproximadamente 5-3000 microgramos/kg de peso corporal, desde aproximadamente 700 -1000 microgramos/kg de peso corporal, o más de aproximadamente 1000 microgramos/kg de peso corporal.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para la administración de un producto génico miR aislado a un sujeto determinado. Por ejemplo, un producto génico miR se puede administrar al sujeto una vez (por ejemplo, como inyección única o de depósito). De manera alternativa, un producto génico miR se puede administrar una vez o dos veces diariamente a un sujeto durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, más particularmente desde aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación particular, un producto génico miR se administra una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad de un producto génico miR administrado al sujeto puede comprender la cantidad total del producto génico administrado durante el régimen de dosificación entero.

Como se utiliza en el presente documento, un producto génico miR “aislado” es uno que se sintetiza, o altera o retira de su estado natural por medio de la intervención humana. Por ejemplo, un producto génico miR sintético, o un producto génico miR parcial o completamente separado de los materiales co-existentes de su estado natural, se considera que está “aislado”. Un producto génico miR aislado puede existir en una forma sustancialmente purificada, o puede existir dentro de la célula a la que se ha suministrado el producto génico miR. Por lo tanto, un producto génico miR que se suministra deliberadamente a, o se expresa en, una célula se considera un producto génico miR “aislado”. Un producto génico miR producido en una célula a partir de una molécula precursora miR también se considera que es una molécula “aislada”. Los productos génicos miR aislados descritos en el presente documento se pueden utilizar para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer pancreático en un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

Los productos génicos miR se puede obtener utilizando varias técnicas de referencia. Por ejemplo, los productos génicos miR se pueden sintetizar químicamente o producirse recombinantemente utilizando métodos conocidos en la técnica. En una realización, los productos génicos miR se sintetizan químicamente utilizando fosforamiditas de ribonucleósido protegidas apropiadamente y un sintetizador convencional de ADN/ARN. Los suministradores comerciales de las moléculas de ARN o reactivos de síntesis incluyen, por ejemplo, Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE. UU.), Pierce Chemical (filial de Perbio Science, Rockford, IL, EE. UU.), Glen Research (Sterling, VA, EE. UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE. UU.) y Cruachem (Glasgow, RU).

De manera alternativa, los productos génicos miR se pueden expresar a partir plásmidos ADN circulares o lineales utilizando cualquier promotor adecuado. Los promotores adecuados para la expresión de ARN a partir de un plásmido incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras U6, o ARN H1 pol III, o promotores de citomegalovirus. La selección de otros promotores está en la experiencia de la técnica. Los plásmidos recombinantes de la invención pueden comprender también promotores inducibles o regulables para la expresión de productos génicos miR en las células cancerosas.

Los productos génicos miR que se expresan de plásmidos recombinantes se pueden aislar de sistemas de expresión celular en cultivos por técnicas de referencia. Los productos génicos miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes también se pueden suministrar a, y expresarse directamente en, las células cancerosas. El uso de plásmidos recombinantes para suministrar productos génicos miR a las células cancerosas se trata con más detalles posteriormente.

Los productos génicos miR se pueden expresar a partir de un plásmido recombinante separado, o se pueden expresar a partir del mismo plásmido recombinante. En una realización, los productos génicos miR se expresan como moléculas precursoras ARN a partir de un solo plásmido; y las moléculas precursoras se procesan en un producto génico miR funcional por un sistema de proceso adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a estos, sistemas de procesamiento que existen en la células cancerosa. Otros sistemas adecuados de sistemas de proceso incluyen, por ejemplo, el sistema de lisado celular de *Drosophila in vitro* (por ejemplo como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de EE. UU. N° 2002/0014113 de Yang y col.).

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

En una realización, un plásmido que expresa los productos génicos miR comprenden una secuencia que codifica un ARN precursor de miR bajo el control del promotor precoz intermedio de CMV. Como se utiliza en el presente documento "bajo el control" de un promotor significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican el producto génico miR se localizan 3' del promotor, de forma que el promotor puede iniciar la transcripción de las secuencias que codifican el producto génico miR.

Los productos génicos miR pueden expresarse también a partir de vectores víricos recombinantes. Se contempla que los productos génicos miR pueden expresarse a partir de dos vectores víricos recombinantes separados, o a partir del mismo vector vírico. El ARN que se expresa a partir de vectores víricos recombinantes puede aislarse en los sistemas de expresión celular en cultivo por técnicas de referencia, o se puede expresar directamente en las células cancerosas. El uso de vectores víricos recombinantes para suministrar los productos génicos miR a las células cancerosas se trata con más detalles posteriormente.

Los vectores víricos recombinantes desvelados en el presente documento comprenden secuencias que codifican productos génicos miR y cualquier promotor adecuado para expresar secuencias de ARN. Los promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a estos, las secuencias promotoras U6 o ARN H1 pol III, o promotores de citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados están en la experiencia de la técnica. Los vectores víricos recombinantes de la invención también comprenden promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos miR en una célula cancerosa.

Se puede utilizar cualquier vector vírico capaz de aceptar una secuencia de nucleótidos que codifique un producto génico miR; por ejemplo, los vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), Rhabdovirus, virus de leucemia murina); herpesvirus, y similares. Se puede modificar también el tropismo de los vectores víricos seudotipando los vectores con proteínas de envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de cápside vírica, como sea adecuado.

Por ejemplo, los vectores lentivíricos de la invención se pueden seudotipar con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola, y similares. Los vectores AAV de la invención se pueden fabricar para dirigirse a diferentes células modificando los vectores para que expresen serotipos de proteína de cápside diferentes. Por ejemplo, un vector AAV que expresa un serotipo de cápside 2 en un serotipo de genoma 2

se llama 2/2. Este serotipo génico de cápside 2 en el vector AAV 2/2 se puede reemplazar por un serotipo génico de cápside 5 para producir un vector AAV 2/5. Las técnicas para construir AAV que expresan diferentes serotipos de proteína de cápside están en la experiencia de la técnica; véase por ejemplo Rabinowitz, J.E., y col. (2002), *J. Virol.* 76:791-801.

5 La selección de vectores víricos recombinantes adecuados para su uso en la invención, los métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar ARN en el vector, los métodos para el suministro del vector vírico a las células de interés, y la recuperación de los productos ARN están dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg (1995), *Gene Therapy* 2:301-310; Eglitis (1988), *Biotechniques* 6:608-614; Miller (1990), *Hum. Gene Therapy* 1:5-14; y Anderson (1998), *Nature* 392:25-30.

15 Los vectores víricos particularmente adecuados son los que se derivan de AV y AAV. Un vector AV adecuado para expresar productos génicos miR, un método para construir el vector recombinante AV, y un método para suministrar el vector en las células diana, se describen en Xia y col. (2002), *Nat. Biotech.* 20:1006-1010. Los vectores AAV adecuados para expresar los productos génicos miR, los métodos para construir el vector AAV recombinante, y los métodos para suministrar los vectores en las células diana se describen en Samulski y col. (1987), *J. Virol.* 61:3096-3101; Fisher y col. (1996), *J. Virol.*, 70:520-532; Samulski y col. (1989), *J. Virol.* 63:3822-3826; Patente de EE. UU. N° 5.252.479; Patente de EE. UU. N° 5.139.941; Solicitud Internacional de Patente N° WO 94/13788; and Solicitud Internacional de Patente N° WO 93/24641. En una realización, los productos génicos miR se expresan a partir de un vector AAV recombinante único que comprende el promotor precoz intermedio CMV.

25 En una cierta realización, un vector vírico recombinante AAV de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN precursor de miR en conexión operativa con una secuencia de terminación poliT bajo el control de un promotor humano ARN U6. Como se utiliza en el presente documento, “en conexión operativa con una secuencia de terminación poliT” significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas en sentido o antisentido están inmediatamente adyacentes a la señal de terminación poliT en la dirección 5'. Durante la transcripción de las secuencias miR a partir del vector, las señales de terminación poliT actúan para terminar la transcripción.

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

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

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

55 Un experto en la técnica también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para administrar un compuesto que inhibe la expresión de miR a un sujeto determinado, como se describe en el presente documento. Los compuestos adecuados para la inhibición de la expresión génica de miR incluyen ARN bicatenario (tal como ARN corto o ARN pequeño de interferencia o “ARNsi”), ácidos nucleicos antisentido, y moléculas de ARN enzimático, tales como las ribozimas. Cada uno de estos compuestos se pueden dirigir a un determinado producto génico miR e interferir en su expresión (por ejemplo, inhibiendo la traducción, induciendo la escisión y/o la degradación) del producto génico miR diana.

60 Por ejemplo, la expresión de un determinado gen miR se puede inhibir induciendo la interferencia del ARN del gen miR con una molécula de ARN aislado bicatenario (“ARNds”) que tiene una homología de secuencia de al menos un 90 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o el 100 %, con al menos una parte del producto génico miR. En una realización particular, la molécula de ARNds es un “ARN corto o pequeño de interferencia” o “ARNsi”.

65 El ARNsi útil en los métodos presentes comprenden el ARN corto bicatenario de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 18 a aproximadamente 25

nucleótidos de longitud. El ARNsi comprende una cadena ARN en sentido y una cadena ARN antisentido complementarias unidas juntas por interacciones de emparejamiento de bases de referencia de Watson-Crick (a partir de aquí “emparejamiento de bases”). La cadena en sentido comprende una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a la secuencia de ácido nucleico contenida en el producto génico miR diana.

5 Como se utiliza en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico en un ARNsi que es “idéntica sustancialmente” a una secuencia diana contenida en el ARNm diana, es una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia diana, o que se diferencia de la secuencia diana por uno o dos nucleótidos. Las cadenas en sentido y antisentido del ARNsi pueden comprender dos moléculas de ARN monocatenario complementarias, o
10 pueden comprender una molécula única en la que dos porciones complementarias tienen un emparejamiento de bases y están unidas covalentemente por un área de cadena única en “horquilla”.

El ARNsi también puede ser un ARN alterado que se diferencia del ARN de origen natural por adición, eliminación o sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como a los extremos del ARNsi o en uno o más nucleótidos internos del ARNsi, o modificaciones que hacen que el ARNsi sea resistente a la digestión por nucleasas, o la sustitución de uno o más nucleótidos en el ARNsi con desoxirribonucleótidos.

Una o ambas cadenas del ARNsi pueden comprender también una protuberancia 3'. Como se utiliza en el presente documento “una protuberancia 3'” se refiere a al menos un nucleótido no emparejado que se extiende desde el extremo 3' o una cadena ARN duplicada. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el ARNsi comprende al menos una protuberancia 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 particular, la protuberancia 3' está presente en ambas cadenas del ARNsi, y tiene 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena de ARNsi puede comprender protuberancias 3' de ácido ditimidílico (“TT”) o ácido diuridílico (“uu”).

El ARNsi se puede producir química o biológicamente, o se puede expresar a partir de un plásmido recombinante o vector vírico, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos miR aislados. Los métodos ejemplares para la producción y ensayo de moléculas de ARNs o ARNsi se describen en la Solicitud de Patente Publicada de EE. UU. N° 2002/0173478 de Gewirtz y en la Solicitud de Patente Publicada de EE. UU. N° 2004/0018176 de Reich y col.

La expresión de un determinado gen miR se puede inhibir también por un ácido nucleico antisentido. Como se utiliza en el presente documento, un “ácido nucleico antisentido” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une a un ARN diana por medio de interacciones ARN-ARN, ARN-ADN o ARN-ácido nucleico peptídico, que alteran la actividad del ARN diana. Los ácidos nucleicos antisentido adecuados para su uso en los presentes métodos son ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ARN, ADN, quimeras ARN-ADN, ácidos nucleicos peptídicos (PNA)) que comprenden en general una secuencia de ácido nucleico complementaria con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico miR. El ácido nucleico antisentido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es complementaria en el 50-100 %, complementaria en el 75-100 %, o complementaria en el 95-100 % con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico miR. Las secuencias de ácido nucleico de productos génicos miR humanos particulares se proporcionan en la Tabla 1a y la Tabla 1b. Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, se cree que los ácidos nucleicos antisentido activan la RNasa H u otras nucleasas celulares que digieren el dúplex producto génico miR/ácido nucleico antisentido.

Los ácidos nucleicos antisentido pueden contener también modificaciones de la matriz de ácido nucleico o del azúcar o restos de bases (o su equivalente) para potenciar la especificidad de diana, resistencia a nucleasas, suministro u otras propiedades relacionadas con la eficacia de la molécula. Tales modificaciones incluyen los restos de colesterol, los intercaladores dúplex, tales como la acridina, o uno o más grupos resistentes a nucleasas.

Los ácidos nucleicos antisentido se pueden producir química o biológicamente, o se pueden expresar a partir de un plásmido recombinante o un vector vírico como se ha descrito anteriormente para los productos génicos miR aislados. Los métodos ejemplares para la producción y el ensayo están en la experiencia de la técnica; véase, por ejemplo, Stein y Cheng (1993), Science 261:1004 y Patente de EE. UU. N° 5.849.902 de Woolf y col.

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

Los ácidos nucleicos enzimáticos se pueden producir química o biológicamente, o se pueden expresar a partir de un

plásmido recombinante o un vector vírico, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos miR. Los métodos ejemplares para producir y ensayar moléculas de ARNds o ARNsi se describen en Werner y Uhlenbeck (1995), *Nucleic Acids Res.* 23:2092-96; Hammann y col. (1999), *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.* 9:25-31; y Patente de EE. UU. Nº 4.987.071 de Cech y col.

5 La administración de al menos un producto génico miR, o al menos un compuesto para la inhibición de la expresión de miR, inhibirá la proliferación de células cancerosas en un sujeto que tiene un cáncer (por ejemplo, un cáncer pancreático). Como se utiliza en el presente documento, "inhibir la proliferación de una célula cancerosa" significa destruir la célula, o detener o enlentecer permanente o temporalmente el crecimiento de la célula. La inhibición de la proliferación de la célula cancerosa se puede deducir si el número de tales células en el sujeto permanece constante o desciende tras la administración de los productos génicos miR o los compuestos de inhibición de la expresión génica de miR. Una inhibición de la proliferación de las células cancerosas se puede deducir también si el número absoluto de tales células aumenta, pero la tasa de crecimiento tumoral disminuye.

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

20 El tamaño de una masa tumoral se puede establecer por observación visual directa, o por métodos de diagnóstico por imagen, tales como los rayos X, la resonancia magnética, ultrasonidos, y escintigrafía. Los métodos de diagnóstico por imagen para establecer el tamaño de la masa tumoral se puede emplear con o sin agentes de contraste, como se conoce en la técnica. El tamaño de una masa tumoral se puede establecer también por medios físicos, tales como palpación de la masa tisular o medición de la masa tisular con un instrumento de medición, como un calibre.

30 Los productos génicos miR o los compuestos de inhibición de la expresión de miR se pueden administrar a un sujeto por cualquier medio adecuado para el suministro de estos compuestos a las células cancerosas del sujeto. Por ejemplo, los productos génicos miR o los compuestos de inhibición de la expresión de miR se pueden administrar por métodos adecuados para transfectar células del sujeto con estos compuestos, o con ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican estos compuestos. En una realización, las células se transfectan con un vector plásmido o vírico que comprenden secuencias que codifican al menos un producto génico miR o un compuesto de inhibición de la expresión de miR.

35 Los métodos de transfección para células eucariotas se conocen bien en la técnica, e incluyen por ejemplo, la inyección directa del ácido nucleico en el núcleo o pronúcleo de una célula; la electroporación, transferencia en liposomas o la transferencia mediada por materiales lipofílicos; suministro de ácido nucleico mediado por receptor, biobalística o aceleración de partículas; precipitación en fosfato cálcico y transfección mediada por vectores víricos.

40 Por ejemplo, las células se pueden transfectar con un compuesto de transferencia liposómica, por ejemplo DOTAP metolsulfato de (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N, N,N-trimetil-amonio, Boehringer-Mannheim) o un equivalente, tal como LIPOFECTINA. La cantidad de ácido nucleico que se utiliza no es crítica para la práctica de la invención; se pueden conseguir resultados aceptables con 0,1-100 microgramos de ácido nucleico por 10^5 células. Por ejemplo, se puede utilizar una relación de aproximadamente 0,5 microgramos de vector plásmido en 3 microgramos de DOTAP por cada 10^5 células.

50 Un producto génico miR o un compuesto de inhibición de la expresión de miR también se puede administrar al sujeto por cualquier vía adecuada de administración entérica o parenteral. Las vías adecuadas para la administración entérica para los presentes métodos incluyen, por ejemplo, el suministro oral, rectal o intranasal. Las vías adecuadas para la administración parenteral incluyen, por ejemplo, la administración intravascular (por ejemplo, inyección intravenosa en embolada, infusión intravenosa, inyección intra-arterial en embolada, infusión intraarterial e instilación por medio de catéter en el sistema vascular); inyección peri- e intratisular (por ejemplo, inyección peri-tumoral e intra-tumoral, inyección intra-retinal, o inyección subretinal); inyección subcutánea o de depósito, incluyendo la infusión subcutánea (tal como por bombas osmóticas); aplicación directa en el tejido de interés, por ejemplo por un catéter u otro dispositivo de emplazamiento (por ejemplo un microgránulo retinal o un supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso); y por inhalación. Las vías particularmente adecuadas de administración son la inyección, infusión e inyección directa en el tumor.

60 En los métodos divulgados en el presente documento, un producto génico miR o un producto de inhibición de la expresión de miR puede administrarse al sujeto sea como ARN desnudo, en combinación con un reactivo de suministro, o como un ácido nucleico (por ejemplo un plásmido recombinante o un vector vírico) que comprende secuencias que expresan el producto génico miR o el compuesto de inhibición de la expresión de miR. Los reactivos de suministro adecuados incluyen, por ejemplo el reactivo lipofílico Mirus Transit TKO; LIPOFECTINA; lipofectamina; cellfectina; policationes (por ejemplo, polilisina) y liposomas.

65 Los plásmidos recombinantes y los vectores víricos comprenden secuencias que expresan productos génicos miR o

compuestos de inhibición de la expresión de miR, y técnicas para el suministro tales plásmidos y vectores en las células cancerosas se tratan en el presente documento y/o son bien conocidas en la técnica.

5 En una realización particular, se utilizan liposomas para suministrar un producto génico miR o un compuesto de inhibición de la expresión de miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a un sujeto. Los liposomas pueden también aumentar la semivida sanguínea de los productos génicos o ácidos nucleicos. Los liposomas adecuados para su uso en la invención se pueden formar a partir de lípidos formadores de vesículas de referencia, que incluyen en general fosfolípidos neutros o cargados negativamente y un esteroles, tal como el colesterol. La selección de los lípidos está dirigida en general por la consideración de factores, tales como el tamaño deseado del liposoma y la semivida de los liposomas en la corriente sanguínea. Se conocen varios métodos para preparar liposomas, por ejemplo, como se describen en Szoka y col. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467; y Patentes de EE. UU. N^{os} 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028, y 5.019.369.

15 Los liposomas para su uso en los métodos desvelados en el presente documento pueden comprender una molécula ligando que dirige al liposoma a las células cancerosas. Se prefieren ligandos que se unen a receptores prevalentes en las células cancerosas, tales como los anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos celulares tumorales.

20 Los liposomas para su uso en los métodos desvelados en el presente documento también se pueden modificar de forma que eviten el aclaramiento por el sistema de macrófagos mononucleares ("MMS") y el sistema reticuloendotelial ("RES"). Tales liposomas modificados pueden tener restos de inhibición de la opsonización en la superficie o incorporados en la estructura del liposoma. Un liposoma puede comprender ambos, restos de inhibición de la opsonización y un ligando.

25 Los restos de inhibición de la opsonización para su uso en la preparación de liposomas son normalmente grandes polímeros hidrofílicos que se unen a la membrana del liposoma. Como se utilizan en el presente documento un resto de inhibición de la opsonización se "une" a una membrana de liposoma cuando está fijado física o químicamente a la membrana, por ejemplo, por intercalación con un ancla liposoluble en la membrana en sí misma, o uniéndose directamente a grupos activos de los lípidos de membrana. Estos polímeros de inhibición de la opsonización forman una capa protectora de superficie que disminuye significativamente la captación de los liposomas por el MMS y RES; por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. N^o 4.920.016.

35 Los restos de inhibición de la opsonización adecuados para modificar liposomas son preferentemente polímeros solubles en agua con un número medio de peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 daltons, y más preferentemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 daltons. Tales polímeros incluyen derivados de polietileno glicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG); por ejemplo, metoxi PEG o PPG, y estearato de PEG o PPG; polímeros sintéticos, tales como poliácridamida o poli N-vinil pirrolidona; poliamidoaminas lineales, ramificadas, o dendríméricas; ácidos poliacrílicos; polialcoholes, por ejemplo, polivinilalcohol y polixilitol a los que se unen químicamente grupos amino o carboxilo, así como gangliósidos, tales como gangliósidos GM₁. También 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 PEG de bloqueo y o bien un poliaminoácido, polisacárido, poliamidoamina, polietilenamina, o polinucleótido. Los polímeros de inhibición de la opsonización también pueden ser polisacáridos naturales que contienen aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péptico, ácido neuramínico, ácido algínico, carragenano; polisacáridos aminados u oligosacáridos (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por ejemplo, que reaccionan con derivados de ácidos carbónicos con la unión resultante de grupos carboxílicos. El resto de inhibición de la opsonización puede ser un PEG, PPG, o un derivado de los mismos. Los liposomas modificados con PEG o con derivados de PEG se denominan a veces "liposomas PEGilados".

50 El resto de inhibición de la opsonización se puede unir a la membrana del liposoma por una cualquiera de las técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida de PEG se puede unir a un ancla liposoluble fosfatidil-etanolamina, y luego se une a una membrana. De manera similar, un polímero de dextrano se puede derivar con un ancla liposoluble estearilamina por medio de la aminación reductora utilizando Na (CN) BH₃ y una mezcla disolvente, tal como tetrahidrofurano y agua en una proporción 30:12, a 60 °C.

55 Los liposomas modificados con restos de inhibición de la opsonización permanecen en la circulación mucho más tiempo que los liposomas sin modificar. Por esta razón, tales liposomas a veces se llaman liposomas "furtivos". Se sabe que los liposomas furtivos se acumulan en tejidos irrigados por un sistema microvascular poroso o "que rezuma". Por lo tanto los tejidos que se caracterizan por tales defectos del sistema microvascular, por ejemplo, los tumores sólidos, acumularán estos liposomas eficazmente; véase Gabizon, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 18: 6949-53 (1988). Además, la reducción de la captación por el RES disminuye la toxicidad de los liposomas furtivos evitando la acumulación significativa de liposomas en el hígado y el bazo. Por lo tanto, los liposomas que se modifican con restos de inhibición de la opsonización son particularmente adecuados para el suministro de productos génicos miR, o compuestos de inhibición de la expresión de miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a las células tumorales.

65 Los productos génicos miR o los compuestos de inhibición de la expresión de miR se pueden formular como

- composiciones farmacéuticas, a veces llamados “medicamentos”, antes de administrarlos a un sujeto, de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. En consecuencia, la invención engloba composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer pancreático. En una realización, la composición farmacéutica comprende al menos un producto génico miR aislado, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular el al menos un producto génico miR se corresponde con un producto génico miR que tiene un nivel de expresión disminuido en las células de cáncer pancreático con respecto a células de control adecuadas (es decir, está regulado negativamente). En cierta realización, el producto génico miR se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-326, miR-155, miR-339, miR-34c, miR-345, miR-152, miR-372, miR-128a y una combinación de los mismos. En una realización, el producto génico aislado no es miR-15a or miR-16-1. En una realización adicional, el producto génico miR no es miR-210 o miR-212. En otra realización, el producto génico miR no es miR-21, miR-143, miR-205 o miR-9. En otra realización, el producto génico miR no es miR-21, miR-191, miR-126*, miR-210, miR-155, miR-143, miR-205, miR-126, miR-30a-5p, miR-140, miR-214, miR-218-2, miR-145, miR-106a, miR-192, miR-203, miR-150, miR-220, miR-212 o miR-9.
- En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento comprenden al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR es específico de un producto génico miR cuya expresión es mayor en las células del cáncer pancreático que en las células de control (es decir, está regulado positivamente). En ciertas realizaciones, el compuesto de inhibición de la expresión de miR es específico para uno o más productos génicos miR seleccionados de entre el grupo que consiste en miR-103-2, miR-107, miR-103-1, miR-342, miR-100, miR-24-2, miR-23a, miR-125a, miR-26a-1, miR-24-1, miR-191, miR-15a, miR-368, miR-26b, miR-125b-2, miR-125b-1, miR-26a-2, miR-335, miR-126, miR-1-2, miR-21, miR-25, miR-92-2, miR-130a, miR-93, miR-16-1, miR-145, miR-17, miR-99b, miR-181b-1, miR-146, miR-181b-2, miR-16-2, miR-99a, miR-197, miR-10a, miR-224, miR-92-1, miR-27a, miR-221, miR-320, miR-7-1, miR-29b-2, miR-150, miR-30d, miR-29a, miR-23b, miR-135a-2, miR-223, miR-3p21-v, miR-128b, miR-30b, miR-29b-1, miR-106b, miR-132, miR-214, miR-7-3, miR-29c, miR-367, miR-30c-2, miR-27b, miR-140, miR-10b, miR-20, miR-129-1, miR-340, miR-30a, miR-30c-1, miR-106a, miR-32, miR-95, miR-222, miR-30e, miR-129-2, miR-345, miR-143, miR-182, miR-1-1, miR-133a-1, miR-200c, miR-194-1, miR-210, miR-181c, miR-192, miR-220, miR-213, miR-323, miR-375 y una combinación de los mismos. En una realización, el producto génico miR aislado no es específico para miR-15a or miR-16-1. En otra realización, el producto génico miR no es específico para miR-210 o miR-212. En otra realización más, el producto génico miR no es específico para miR-21, miR-143, miR-205 o miR-9. En otra realización más, el producto génico miR no es específico para miR-21, miR-191, miR-126*, miR-210, miR-155, miR-143, miR-205, miR-126, miR-30a-5p, miR-140, miR-214, miR-218-2, miR-145, miR-106a, miR-192, miR-203, miR-150, miR-220, miR-212 o miR-9.
- Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se caracterizan por ser al menos estériles y libres de pirógenos. Como se utiliza en el presente documento, “composiciones farmacéuticas” incluyen las composiciones para uso veterinario y en seres humanos. Los métodos para preparar composiciones farmacéuticas de la invención están en la experiencia de la técnica, por ejemplo, como se describe en Remington’s Pharmaceutical Science, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA. (1985).
- Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento comprenden al menos un producto génico miR o un compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico miR o el compuesto de inhibición de la expresión génica de miR) (por ejemplo 0,1 a 90 % por peso), o una sal fisiológicamente aceptable de los mismos, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención comprende adicionalmente uno o más agentes anti-cáncer (por ejemplo, agentes quimioterápicos). Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender también al menos un producto génico miR o un compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico miR o un compuesto de inhibición de la expresión génica de miR), que está encapsulado por liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende un gen miR o un producto génico que no es miR-15, miR-16, miR-143 y/o miR-145.
- Los 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.
- En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden al menos un producto génico miR o un compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico miR o el compuesto de inhibición de la expresión génica de miR) que es resistente a la degradación por nucleasas. Un experto en la técnica puede fácilmente sintetizar ácidos nucleicos que sean resistentes a nucleasas, por ejemplo, incorporando uno o más ribonucleótidos que estén modificados en la posición 2’ en el producto génico miR. Los ribonucleótidos modificados en 2’ adecuados incluyen los que se han modificado en la posición 2’ con fluoro, amino, alquil, alcoxi, y O-alil.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender también excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen los estabilizadores, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolaridad, tampones y agentes de ajuste del pH. Los aditivos adecuados incluyen los

tampones fisiológicamente compatibles (por ejemplo, hidrócloruro de trometamina), quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos de calcio quelado (por ejemplo, DTPA cálcico, CaNaDTPA-bisamida), u, opcionalmente, adiciones de sales de sodio o calcio (por ejemplo, cloruro cálcico, ascorbato cálcico, gluconato cálcico o lactato cálcico). Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden envasar en forma líquida, o pueden estar liofilizadas.

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

Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida para administración oral puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes enumerados anteriormente y un 10-95 %, preferentemente un 25 %-75 %, del producto génico miR o un compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico miR o el compuesto de inhibición de la expresión génica de miR). Una composición farmacéutica para su administración en aerosol (por inhalación) puede comprender del 0,01-20 % por peso, preferentemente 1-10 % por peso, del producto génico miR o un compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico miR o el compuesto de inhibición de la expresión génica de miR) encapsulado en un liposoma, como se ha descrito anteriormente, y un propelente. Se puede incluir también un vehículo si se desea, por ejemplo, lecitina para el suministro intranasal.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además uno o más agentes anti-cáncer. En una realización particular, las composiciones comprenden al menos un producto génico miR o un compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico miR o el compuesto de inhibición de la expresión génica de miR) y al menos un agente quimioterápico. Los agentes quimioterápicos que son adecuados para los métodos desvelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a estos, agentes alquilantes de ADN, agentes antibióticos antitumorales, agentes anti-metabólicos, agentes estabilizantes de tubulina, agentes desestabilizantes de tubulina, agentes antagonistas de hormonas, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la proteína quinasa, inhibidores de HMG-CoA, inhibidores de CDK, inhibidores de la ciclina, inhibidores de la caspasa, inhibidores de la metaloproteínasa, ácidos nucleicos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ácidos nucleicos, y agentes víricos, bacterianos o exotóxicos modificados molecularmente. Ejemplos de agentes particularmente adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a estos, arabinósido de citidina, metotrexato, vincristina, etopósido (VP-16), doxorubicina (adriamicina) cisplatino (CDDP), dexametasona, arglabin, ciclofosfamida, sarcolisina, metilnitrosourea, fluorouracilo, 5-fluorouracilo (5FU), vinblastina, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, oxaliplatino, irinotecán, topotecán, leucovorín, carmustina, estreptozocina, CPT-11, taxol y derivados del mismo, tamoxifeno, dacarbazina, rituximab, daunorubicina, 1- β -D.-arabinofuranosilcitosina, imatinib, fludarabina, docetaxel y FOLFOX4.

Se desvelan en el presente documento métodos para identificar un agente anti-cáncer pancreático, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR en la célula. En una realización, el método comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR asociado con la disminución de niveles de expresión en las células del cáncer pancreático. Un aumento en el nivel del producto génico miR en la célula, con respecto a un control adecuado (por ejemplo, el nivel del producto génico miR en una célula de control) es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti-cáncer pancreático. En una realización particular, el al menos un producto génico asociado con una disminución de los niveles de expresión en las células del cáncer pancreático se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-326, miR-155, miR-339, miR-34c, miR-345, miR-152, miR-372, miR-128a y una combinación de los mismos. En una realización, el producto génico miR no es uno o más de let7a-2, let-7c, let-7g, let-7i, miR-7-2, miR-7-3, miR-9, miR-9-1, miR-10a, miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-24-1, miR-24-2, miR-25, miR-29b-2, miR-30, miR-30a-5p, miR-30c, miR-30d, miR-31, miR-32, miR-34, miR-34a, miR-34a prec, miR-34a-1, miR-34a-2, miR-92-2, miR-96, miR-99a, miR-99b prec, miR-100, miR-103, miR-106a, miR-107, miR-123, miR-124a-1, miR-125b-1, miR-125b-2, miR-126*, miR-127, miR-128b, miR-129, miR-129-1/2 prec, miR-132, miR-135-1, miR-136, miR-137, miR-141, miR-142-as, miR-143, miR-146, miR-148, miR-149, miR-153, miR-155, miR-159-1, miR-181, miR-181b-1, miR-182, miR-186, miR-191, miR-192, miR-195, miR-196-1, miR-196-1 prec, miR-196-2, miR-199a-1, miR-199a-2, miR-199b, miR-200b, miR-202, miR-203, miR-204, miR-205, miR-210, miR-211, miR-212, miR-214, miR-215, miR-217, miR-221 y/o miR-223.

En otras realizaciones, el método comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico miR asociado con un aumento de los niveles de expresión en las células del cáncer pancreático. Una disminución del nivel del producto génico miR asociado con el aumento de los niveles de expresión en la célula del cáncer pancreático, con respecto a un control adecuado (por ejemplo, el nivel del producto génico miR en una célula de control), es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti-cáncer pancreático. En una realización particular, el al menos un producto génico miR asociado con el aumento de los niveles de expresión en las células del cáncer pancreático se seleccionan de entre el grupo que consiste en miR-103-2, miR-107, miR-103-1, miR-342, miR-100, miR-24-2, miR-23a, miR-125a, miR-26a-1, miR-24-1, miR-191, miR-15a, miR-368, miR-

26b, miR-125b-2, miR-125b-1, miR-26a-2, miR-335, miR-126, miR-1-2, miR-21, miR-25, miR-92-2, miR-130a, miR-93, miR-16-1, miR-145, miR-17, miR-99b, miR-181b-1, miR-146, miR-181b-2, miR-16-2, miR-99a, miR-197, miR-10a, miR-224, miR-92-1, miR-27a, miR-221, miR-320, miR-7-1, miR-29b-2, miR-150, miR-30d, miR-29a, miR-23b, miR-135a-2, miR-223, miR-3p21-v, miR-128b, miR-30b, miR-29b-1, miR-106b, miR-132, miR-214, miR-7-3, miR-29c, 5 miR-367, miR-30c-2, miR-27b, miR-140, miR-10b, miR-20, miR-129-1, miR-340, miR-30a, miR-30c-1, miR-106a, miR-32, miR-95, miR-222, miR-30e, miR-129-2, miR-345, miR-143, miR-182, miR-1-1, miR-133a-1, miR-200c, miR-194-1, miR-210, miR-181c, miR-192, miR-220, miR-213, miR-323, miR-375 y una combinación de los mismos. En una realización el producto génico miR no es uno o más de let7a-2, let-7c, let-7g, let-7i, miR-7-2, miR-7-3, miR-9, miR-9-1, miR-10a, miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-24-1, miR-24-2, miR-10 25, miR-29b-2, miR-30, miR-30a-5p, miR-30c, miR-30d, miR-31, miR-32, miR-34, miR-34a, miR-34a prec, miR-34a-1, miR-34a-2, miR-92-2, miR-96, miR-99a, miR-99b prec, miR-100, miR-103, miR-106a, miR-107, miR-123, miR-124a-1, miR-125b-1, miR-125b-2, miR-126*, miR-127, miR-128b, miR-129, miR-129-1/2 prec, miR-132, miR-135-1, miR-136, miR-137, miR-141, miR-142-as, miR-143, miR-146, miR-148, miR-149, miR-153, miR-155, miR 159-1, miR-181, miR-181b-1, miR-182, miR-186, miR-191, miR-192, miR-195, miR-196-1, miR-196-1 prec, miR-196-2, miR-15 199a-1, miR-199a-2, miR-199b, miR-200b, miR-202, miR-203, miR-204, miR-205, miR-210, miR-211, miR-212, miR-214, miR-215, miR-217, miR-221 y/o miR-223.

Los 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 20 recombinantemente, sintéticamente, o puede aislarse (es decir, purificarse) de una fuente natural. Se conocen bien en la técnicas varios métodos para proporcionar tales agentes a una célula (por ejemplo, transfección), y varios de estos métodos se han descrito anteriormente en el presente documento). Los métodos para detectar la expresión de al menos un producto génico miR (por ejemplo, transferencia de Northern, hibridación in situ, RT-PCR, perfil de expresión) también se conocen bien en la técnica. Varios de estos métodos también se han descrito en el presente 25 documento.

La invención se ilustrará ahora por los siguientes ejemplos no limitantes.

30 Ejemplificación

Materiales y métodos

Datos de pacientes, enriquecimiento de células neoplásicas y extracción de ARN

35 Se muestran en la Tabla 2, las características clinicopatológicas de 40 PET y cuatro PACC, recobrados del banco de tejidos congelados del Departamento de Patología de la Universidad de Verona, Italia. Todos los tumores eran esporádicos, como evaluó el personal y las historias familiares obtenidas por entrevistas directas con los pacientes. Los PET se diagnosticaron por análisis histopatológico y de marcadores celulares, y se clasificaron de acuerdo con los criterios de la OMS (Kloppel, G., y col., "The Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Cell System and Its 40 Tumors: The WHO Classification." Ann. N. Y. Acad. Sci. 1014:13-27 (2004)). En estos se incluían 28 tumores no funcionales y 12 funcionales. Los 28 NF-PET incluían 11 tumores endocrinos bien diferenciados (WDET) y 18 carcinomas endocrinos bien diferenciados (WDEC). Los 12 F-PET eran insulinomas, que comprendían 11 WDET y 1 WDEC. Los WDET se consideraron con un comportamiento biológico benigno o incierto según con los criterios de la OMS, que consideran el tamaño del tumor, el índice Ki-67 de proliferación y la invasión vascular (Tabla 2). El diagnóstico de PACC se confirmó por la expresión inmunohistoquímica de lipasa, amilasa y tripsina en las células 45 neoplásicas. Como control, se tomaron páncreas normales en 12 especímenes correspondientes de los pacientes.

Se obtuvo una celularidad neoplásica de más del 90 % en todos los casos con microdissección o enriquecimiento criostático. Se extrajo el ARN total con Trizol ((Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante, de al 50 menos diez secciones del criostato de 20-30 µm de grosor, revisando la composición celular de la muestra cada 5 secciones. La integridad del ARN total se confirmó en cada caso utilizando el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Tabla 2. Datos clinicopatológicos de los tumores pancreáticos endocrinos y acinares

Caso ³	Sexo	Edad	Tamaño (cm)	Diagnóstico ³	Invasión ³	Metástasis		Invasión Vascular	Insulina ⁴ IHQ	Ki67 ⁵ (%)
						GL ¹	Higado			
F-K29	F	46	9	WDEC	sí	sí	sí	sí	pos-d	20
F-K11	F	46	1,5	WDET-b	no	no	no	no	pos	2
F-K36	M	23	1,3	WDET-b	no	no	no	no	pos-d	2
F-Q2	M	51	1,5	WDET-b	no	no	no	no	pos	2
F-Q4	F	63	1,2	WDET-b	no	no	no	no	pos-d	1
F-Q6	M	51	1,3	WDET-b	no	no	no	no	pos	1
F-K20	F	27	5	WDET-i	no	no	no	no	pos	5
F-K47	M	66	2,5	WDET-i	no	no	no	no	pos-d	1
F-K66	M	33	5	WDET-i	no	no	no	sí	pos-d	10
F-K69	M	67	2,5	WDET-i	no	no	no	no	pos	n,d, ⁹
F-K80	F	35	4	WDET-i	no	no	no	no	pos	1
F-Q14	M	41	1,3	WDET-i	no	no	no	no	pos	3
NF-K14	M	48	11	WDEC	sí	no	no	sí	neg	5
NF-K15	M	44	18	WDEC	sí	sí	no	sí	neg	20
NF-K16	M	48	6,5	WDEC	sí	sí	no	sí	n,d,	3
NF-K19	F	37	4	WDEC	no	sí	no	no	neg	30
NF-K23	M	56	7	WDEC	sí	sí	sí	sí	pos	5
NF-K25	F	60	2	WDEC	sí	no	no	sí	neg	2
NF-K3	M	42	4,5	WDEC	sí	sí	sí	sí	neg	8
NF-K31	F	54	3	WDEC	sí	sí	sí	sí	neg	20
NF-K32	F	61	4,5	WDEC	no	no	sí	sí	neg	15
NF- K37	F	35	3	WDEC	no	sí	no	no	neg	2
NF- K42	F	65	4,5	WDEC	sí	sí	no	no	neg	2
NF-K43	M	53	4	WDEC	sí	sí	sí	sí	pos-d	10
NF-K6	F	51	12	WDEC	no	no	sí	sí	neg	7
NF-K76	F	40	5,5	WDEC	no	sí	no	sí	neg	5
NF-K9	F	70	5,5	WDEC	sí	sí	sí	sí	n,d,	25
NF-Q12	M	56	4,5	WDEC	sí	no	no	sí	neg	2
NF-Q5	M	38	3	WDEC	sí	sí	sí	sí	neg	3
NF-K63	M	58	1,2	WDET-b	no	no	no	no	neg	2
NF-K8	F	42	1,5	WDET-b	no	no	no	no	neg	2
NF-K10	F	66	1,5	WDET-i	no	no	no	no	neg	2

(continuación)

Caso ³	Sexo	Edad	Tamaño (cm)	Diagnóstico ³	Invasión ⁰	Metástasis		Invasión Vascular	Insulina ^d IHQ	Ki67 ^e (%)
						GL ^f	Higado			
NF-K13	F	66	2	WDET-i	no	no	no	no	neg	2
NF-K2	M	68	1,5	WDET-i	no	no	no	sí	n.d.	1
NF-K24	F	49	11	WDET-i	no	no	no	no	neg	1
NF-K35	M	40	8	WDET-i	no	no	no	no	neg	2
NF- K41	M	39	3	WDET-i	no	no	no	sí	neg	1
NF-K7	M	57	2	WDET-i	no	no	no	no	neg	3
NF- K75	F	69	2,5	WDET-i	no	no	no	no	neg	1
NF-Q13	F	65	3	WDET-i	no	no	no	sí	neg	2
AC-K53	M	36	7	ACC	no	no	no	sí	neg	10
AC- K54	M	64	5	ACC	no	no	no	no	neg	12
AC-K58	M	39	6	ACC	sí	sí	sí	sí	neg	15
AC-K60	M	52	17	ACC	sí	sí	sí	sí	neg	n.d.

³ Los casos se identificaron con un número aleatorio asignado precedido por F o NF si eran tumores endocrinos Funcionales, o No Funcionales, respectivamente.
^bWDEC, carcinoma endocrino bien diferenciado; WDET-b, tumor endocrino bien diferenciado con comportamiento benigno, WDET-i, tumor endocrino bien diferenciado con comportamiento biológico incierto.

^c Invasión de la grasa peripancrática y/u órganos adyacentes (por ejemplo, duodeno, colédoco, bazo).

^dIHQ, inmunohistoquímica; pos, positivo; pos-w, positive con señal débil; neg, negativo.

^e Índice de proliferación medido por inmunohistoquímica Ki67.

^fGL, ganglios linfáticos.

^gn.d., no disponible.

Hibridación en micromatriz de microARN y cuantificación

El marcado del microARN y la hibridación en chips de micromatrices de microARN se llevaron a cabo como se había descrito anteriormente (Liu, C.G., y col., "An Oligonucleotide Microchip for Genome-Wide microRNA Profiling in Human and Mouse Tissues." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9740-44 (2004)). En resumen, se transcribieron inversamente 5 µg de ARN total de cada muestra utilizando octámeros aleatorios marcados en el extremo de biotina. Se llevó a cabo la hibridación en el chip de micromatrices de microARN fabricado a medida de los inventores (OSU-CCC versión 2.0) que contenían sondas para 460 microARN maduros (235 *Homo sapiens*, 222 *Mus musculus*, y 3 *Arabidopsis thaliana*) aplicados puntualmente por cuadruplicado con sitios activos anotados. A menudo existe un grupo de zonas para un determinado microARN maduro. Adicionalmente, hay sondas cuadruplicadas que corresponden a la mayoría de los pre-microARN para detectar un precursor ARN. La micromatriz también incluye sondas para varios cortes y empalmes ARNs, incluido U6. Las señales de hibridación se detectaron con el conjugado Estreptavidina-Alexa647 y se comprobó utilizando el Axon 4000B. La comprobación por imagen se cuantificó utilizando el software GenePix 6.0 (Axon Instruments (ahora Molecular Devices Corp.), Sunnyvale, CA).

Análisis computacional de los datos de las micromatrices de microARN

La mayoría de los análisis y gráficos se generaron utilizando el software R v. 2.0.1 y los programas Bioconductor v. 1.6 (Gentleman, R.C., y col., "Bioconductor: Open Software Development for Computational Biology and Bioinformatics." *Genome Biol.* 5:R80 (2004)). Secuencialmente, los controles de manchas blanco y de sonda se retiraron del grupo de datos de las 56 micromatrices de microARN, y se restó entonces el fondo local de la señal media. Luego, los datos se normalizaron utilizando una transformación estabilizante de la varianza estratificada, con cada matriz, por polarización en el programa *vsr*. Posteriormente, se utilizó el programa *genefilter* para retirar todas las manchas cuyas intensidades eran menores del percentil 99 de las manchas blancas en todas las matrices. La hibridación en sondas control blanco/negativo y posteriormente el análisis de Northern indicaron que el valor absoluto del log de las señales transformadas menores de 4,5 eran poco fiables.

Los datos obtenidos se analizaron más por comparación directa alterada de dos clases utilizando el paquete *samr*. Las tablas de los microARN expresados diferencialmente se obtuvieron aplicando los criterios de aportación (basada en las veces que cambia y valor delta) que se muestran específicamente en su título. Con el fin de aumentar la rigurosidad, las sondas de microARN se filtraron reteniendo las que tenían al menos tres réplicas significativas.

El análisis del grupo jerárquico se llevó a cabo utilizando los valores agregados de las manchas replicadas obtenidas aplicando el algoritmo de suavización de medianas de Tukey. Se hizo el análisis utilizando las primeras 200 sondas con el mayor intervalo intercuartil que contenía las secuencias maduras de microARN. La métrica de las distancias utilizada para los grupos de muestras y genes eran la correlación Pearson y la distancia Euclidiana, respectivamente. El método aglomerativo era la unión completa. El resultado se visualizó utilizando Maple Tree (version 0.2.3.2) (www.mapletree.sourceforge.net). Todos los datos se remitieron utilizando MIAMExpress a la base de datos Array Express.

El nivel de expresión coordinada entre los microARN se midió por correlación de Pearson y los genes microARN se asignaron al mismo grupo cuando su distancia era menor de 50 kb (Baskerville, S. y D.P. Bartel, "Microarray Profiling of microRNAs Reveals Frequent Coexpression with Neighboring miRNAs and Host Genes." *RNA* 11: 241-47 (2005)). Luego, el grupo de valores de correlación medidos entre los microARN que pertenecen al mismo grupo se compararon con el grupo de valores de correlación medido entre cada uno de los microARN en un grupo frente a los otros microARN fuera de ese grupo utilizando el ensayo no paramétrico de Mann-Whitney.

Transferencia de Northern

Se procesaron cinco µg en PAGE Criterion precolado/ geles de urea (Bio-Rad, Hercules, CA), se transfirió en una membrana Hybond-N+ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se hibridaron una noche con sondas ADN marcadas en el extremo con ³²P a 37 °C en tampón de hibridación ULTRAhyb™-Oligo (Ambion, Austin, TX). Se lavaron las membranas a 37 °C dos veces durante 30 minutos cada una con 2x SSC/0,5 % SDS. Las sondas ASN eran oligonucleótidos antisentido respecto a los microARN maduros y a 5SARN como control. Los filtros se analizaron utilizando un Typhoon 9410 phosporimager (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se cuantificaron utilizando ImageQuant TL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las transferencias se separaron por cocción en SDS acuoso al 0,1 % durante cinco minutos y se resondearon varias veces.

Resultados

Se determinaron los perfiles de expresión de microARN para 12 muestras de páncreas normales y 44 tumores pancreáticos, incluyendo 40 PET y cuatro PACC, utilizando una micromatriz a medida. Esta plataforma había probado dar resultados robustos, como se había validado en varios estudios previos (Liu, C.G., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9740-44 (2004); Calin, G., y col., *New Engl. J. Med.* 353(17):1793-1801 (2005); Iorio, M.V., y col., *Cancer Res.* 65:7065-70 (2005)). Se proporcionó más apoyo con el hallazgo de que los microARN que se unían

físicamente en grupos genómicos se co-expresaban, confirmando que los genes de microARN agrupados mostraban una expresión coordinada (Baskerville, S., y D.P. Bartel, RNA 11:241-47 (2005); Altuvia, Y., y col., Nucleic Acids Res. 33:2697-2706 (2005)).

5 El análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado, utilizando los doscientos microARN más variables, mostraba un patrón de expresión de microARN común que distinguía entre tumores pancreáticos endocrinos y tumores acinares, de páncreas normales (FIG 1A-1E). Particularmente los PACC se encontraban en el único grupo que era parte del grupo más amplio que incluía todos los PET, mientras que no había un patrón distintivo entre insulinomas y NF-PET.

10 El análisis de comparación de clases confirmó la expresión diferencial de varios microARN entre PACC o PET y tejido normal, aunque se expresaban diferencialmente un número más pequeño de microARN entre PACC y PET, así como entre el subgrupo WDEC de PET y PACC. En particular, PET mostraba 87 microARN regulados positivamente y 8 regulados negativamente, al compararse con páncreas normal (Tabla 3), mientras que PACC tenía 30 microARN regulados positivamente y 7 regulados negativamente (Tabla 4). Solo 19 microARN se expresaban diferencialmente entre PET y PACC (Tabla 5), y cuatro eran únicos de WDEC, con respecto a PACC (Tabla 6).

20 **Tabla 3. MicroARN que se expresan diferencialmente entre PET y masa pancreática normal (FDR: 0 % en el percentil 90 y 2 veces)**

MicroARN regulados positivamente

Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-103-2	12,017	14,52	0	MI0000108	20p13	Sí	20
hsa-mir-107	11,885	15,94	0	MI0000114	10q23.31	Sí	20
hsa-mir-103-1	11,296	14,18	0	MI0000109	5q34	Sí	20
hsa-mir-342	10,970	10,09	0	MI0000805	14q32.2	Sí	186
hsa-mir-100	10,277	9,71	0	MI0000102	11q24.1	Sí	17
hsa-mir-24-2	10,116	6,20	0	MI0000081	19p13.12	Sí	38
hsa-mir-23a	9,468	7,11	0	MI0000079	19p13.12	Sí	32
hsa-mir-125a	9,011	7,52	0	MI0000469	19q13.41	Sí	9
hsa-mir-26a-1	8,787	5,34	0	MI0000083	3p22.3	Sí	39
hsa-mir-24-1	8,762	4,67	0	MI0000080	9q22.32	Sí	38
hsa-mir-191	8,570	5,78	0	MI0000465	3p21.31	Sí	176
hsa-mir-15a	7,774	3,94	0	MI0000069	13q14.2	Sí	24
hsa-mir-368	7,718	6,61	0	MI0000776	14q32.31	Sí	124
hsa-mir-26b	7,710	5,15	0	MI0000084	2q35	Sí	39
hsa-mir-125b-2	7,687	6,52	0	MI0000470	21q21.1	Sí	9
hsa-mir-125b-1	7,623	8,08	0	MI0000446	11q24.1	Sí	9
hsa-mir-26a-2	7,498	5,52	0	MI0000750	12q14.1	Sí	39
hsa-mir-335	7,361	2,94	0	MI0000816	7q32.2	Sí	192
hsa-mir-126	7,210	6,06	0	MI0000471	9q34.3	Sí	127
hsa-mir-1-2	7,170	6,58	0	MI0000437	18q11.2	Sí	35
hsa-mir-21	7,030	5,78	0	MI0000077	17q23.2	Sí	61
hsa-mir-25	7,017	4,16	0	MI0000082	7q22.1	Sí	69
hsa-mir-92-2	7,005	3,86	0	MI0000094	Xq26.2	Sí	30
hsa-mir-130a	6,985	4,32	0	MI0000448	11q12.1	Sí	50
hsa-mir-93	6,971	3,56	0	MI0000095	7q22.1	Sí	2
hsa-mir-16-1	6,785	4,57	0	MI0000070	13q14.2	Sí	46
hsa-mir-145	6,770	4,49	0	MI0000461	5q32	Sí	70
hsa-mir-17	6,759	4,03	0	MI0000071	13q31.3	Sí	2
hsa-mir-181b-1	6,645	4,80	0	MI0000270	1q31.3	Sí	44
hsa-mir-146	6,639	4,29	0	MI0000477	5q33.3	Sí	109
hsa-mir-181b-2	6,613	4,45	0	MI0000683	9q33.3	Sí	44
hsa-mir-16-2	6,613	3,90	0	MI0000115	3q25.33	Sí	46
hsa-mir-99a	6,561	4,35	0	MI0000101	21q21.1	Sí	17
hsa-mir-197	6,512	2,44	0	MI0000239	1p13.3	Sí	112
hsa-mir-10a	6,447	4,44	0	MI0000266	17q21.32	Sí	33
hsa-mir-224	6,445	2,93	0	MI0000301	Xq28	Sí	85
hsa-mir-92-1	6,442	3,08	0	MI0000093	13q31.3	Sí	30
hsa-mir-27a	6,255	3,34	0	MI0000085	19p13.12	Sí	40
hsa-mir-221	6,171	8,97	0	MI0000298	Xp11.3	Sí	90
hsa-mir-320	6,143	2,38	0	MI0000542	8p21.3	Sí	162
hsa-mir-7-1	6,133	4,84	0	MI0000263	9q21.32	Sí	12

ES 2 524 018 T3

hsa-mir-29b-2	6,110	4,07	0	MI0000107	1q32.2	Sí	8
hsa-mir-150	6,033	2,63	0	MI0000479	19q13.33	Sí	178
hsa-mir-30d	5,930	5,11	0	MI0000255	8q24.22	Sí	28
hsa-mir-29a	5,930	3,87	0	MI0000087	7q32.3	Sí	8
hsa-mir-23b	5,803	3,02	0	MI0000439	9q22.32	Sí	32
hsa-mir-135a-2	5,675	2,86	0	MI0000453	12q23.1	Sí	31
hsa-mir-223	5,580	3,46	0	MI0000300	Xq12	Sí	68
hsa-mir-3p21-v	5,579	2,32	0	ND	ND	Sí	ND
hsa-mir-128b	5,557	4,35	0	MI0000727	3p22.3	Sí	51
hsa-mir-30b	5,551	4,25	0	MI0000441	8q24.22	Sí	27
hsa-mir-29b-1	5,456	3,14	0	MI0000105	7q32.3	Sí	8
hsa-mir-106b	5,448	2,37	0	MI0000734	7q22.1	Sí	2
hsa-mir-132	5,445	6,39	0	MI0000449	17p13.3	Sí	110
hsa-mir-214	5,440	2,58	0	MI0000290	1q24.3	Sí	62
hsa-mir-7-3	5,418	4,72	0	MI0000265	19p13.3	Sí	12
hsa-mir-29c	5,406	3,12	0	MI0000735	1q32.2	Sí	8
hsa-mir-367	5,398	3,47	0	MI0000775	4q25	Sí	NA
hsa-mir-30c-2	5,356	4,10	0	MI0000254	6q13	Sí	27
hsa-mir-27b	5,344	2,98	0	MI0000440	9q22.32	Sí	40
hsa-mir-140	5,251	3,09	0	MI0000456	16q22.1	Sí	95
hsa-mir-10b	5,218	3,46	0	MI0000267	2q31.1	Sí	33
hsa-mir-20	5,208	3,45	0	MI0000076	13q31.3	Sí	2
hsa-mir-129-1	5,143	3,97	0	MI0000252	7q32.1	No	93
hsa-mir-340	5,123	2,67	0	MI0000802	5q35.3	Sí	181
hsa-mir-30a	5,119	3,29	0	MI0000088	6q13	Sí	28
hsa-mir-30c-1	5,065	3,88	0	MI0000736	1 p34.2	Sí	27
hsa-mir-106a	4,974	2,81	0	MI0000113	Xq26.2	Sí	2
hsa-mir-32	4,763	2,34	0	MI0000090	9q31.3	Sí	63
hsa-mir-95	4,582	2,53	0	MI0000097	4p16.1	Sí	87
hsa-mir-222	4,417	3,48	0	MI0000299	Xp11.3	Sí	103
hsa-mir-30e	4,149	4,01	0	MI0000749	1p34.2	Sí	28
hsa-mir-129-2	3,946	2,27	0	MI0000473	11p11.2	Sí	93
hsa-mir-345	3,909	2,31	0	MI0000825	14q32.2	Sí	193
hsa-mir-143	3,808	2,58	0	MI0000459	5q32	Sí	74
hsa-mir-182	3,762	3,78	0	MI0000272	7q32.2	Sí	126
hsa-mir-1-1	3,674	2,22	0	MI0000651	20q13.33	Sí	35
hsa-mir-133a-1	3,583	2,66	0	MI0000450	18q11.2	Sí	25
hsa-mir-200c	3,463	3,08	0	MI0000650	12p13.31	Sí	111
hsa-mir-194-1	3,345	3,57	0	MI0000488	1q41	Sí	54
hsa-mir-210	3,330	2,73	0	MI0000286	11p15.5	Sí	134
hsa-mir-181c	3,116	2,38	0	MI0000271	19p13.12	Sí	21
hsa-mir-192	2,905	2,71	0	MI0000234	11q13.1	Sí	64
hsa-mir-220	2,877	2,45	0	MI0000297	Xq25	Sí	101
hsa-mir-213	2,825	2,61	0	MI0000289	1q31.3	Sí	21
hsa-mir-323	2,589	3,75	0	MI0000807	14q32.31	Sí	23

microARN regulados negativamente

Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-326	-6,697	0,36	0	MI0000808	11q13.4	Sí	148
hsa-mir-155	-6,357	0,21	0	MI0000681	21 p21.3	Sí	150
hsa-mir-339	-5,531	0,41	0	MI0000815	7q22.3	Sí	191
hsa-mir-34c	-4,924	0,42	0	MI0000743	11q23.1	Sí	94
hsa-mir-345	-4,873	0,49	0	MI0000825	14q32.2	Sí	193
hsa-mir-152	-4,837	0,50	0	MI0000462	17q21.32	No	59
hsa-mir-372	-4,221	0,43	0	MI0000780	19q13.42	Sí	217
hsa-mir-128a	-4,149	0,50	0	MI0000447	2q21.3	No	51

(a) Puntuación: Valores estadísticos T

(b) valor de q: es la tasa más baja de falsos descubrimiento al que el gen se denomina significativo. Es similar al más familiar "valor p", adaptado al análisis de un gran número de genes.

(c) Sitio activo: indica si la sonda contiene la forma madura del microARN.

(d) Familia microARN. relaciona el microARN basándose en la homología en las regiones flanqueantes de la horquilla como se informa en la base de datos de secuencias mirBase – Realización 7.0

Tabla 4. microARN que se expresan diferencialmente entre ACC y masa pancreática normal (FDR: 0 % en el percentil 90 y 2 veces)

microARN regulados positivamente							
Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-103-2	3,926	6,46	0	MI0000108	20p13	Sí	20
hsa-mir-25	3,871	4,79	0	MI0000082	7q22.1	Sí	69
hsa-mir-200c	3,828	3,88	0	MI0000650	12p13.31	Sí	111
hsa-mir-335	3,702	3,46	0	MI0000816	7q32.2	Sí	192
hsa-mir-21	3,532	5,22	0	MI0000077	17q23.2	Sí	61
hsa-mir-103-1	3,474	6,09	0	MI0000109	5q34	Sí	20
hsa-mir-92-1	3,419	3,13	0	MI0000093	13q31.3	Sí	30
hsa-mir-181b-2	3,369	3,35	0	MI0000683	9q33.3	Sí	44
hsa-mir-191	3,344	4,95	0	MI0000465	3p21.31	Sí	176
hsa-mir-93	3,299	3,60	0	MI0000095	7q22.1	Sí	2
hsa-mir-26a-1	3,248	3,85	0	MI0000083	3p22.3	Sí	39
hsa-mir-17	3,211	3,76	0	MI0000071	13q31.3	Sí	2
hsa-mir-20	3,201	3,37	0	MI0000076	13q31.3	Sí	2
hsa-mir-107	3,195	6,16	0	MI0000114	10q23.31	Sí	20
hsa-mir-26b	3,185	4,15	0	MI0000084	2q35	Sí	39
hsa-mir-215	3,123	4,70	0	MI0000291	1q41	Sí	64
hsa-mir-92-2	3,088	3,60	0	MI0000094	Xq26.2	Sí	30
hsa-mir-192	3,044	3,24	0	MI0000234	11q13.1	Sí	64
hsa-mir-342	2,997	3,37	0	MI0000805	14q32.2	Sí	186
hsa-mir-100	2,918	3,36	0	MI0000102	11q24.1	Sí	17
hsa-mir-3p21-v	2,895	2,35	0	ND	ND	Sí	ND
hsa-mir-106a	2,833	3,02	0	MI0000113	Xq26.2	Sí	2
hsa-mir-15a	2,809	2,83	0	MI0000069	13q14.2	Sí	24
hsa-mir-23a	2,748	4,23	0	MI0000079	19p13.12	Sí	32
hsa-mir-181b-1	2,732	4,00	0	MI0000270	1q31.3	Sí	44
hsa-mir-128b	2,709	2,58	0	MI0000727	3p22.3	Sí	51
hsa-mir-106b	2,485	2,50	0	MI0000734	7q22.1	Sí	2
hsa-mir-194-1	2,432	3,21	0	MI0000488	1q41	Sí	54
hsa-mir-219-1	2,404	2,06	0	MI0000296	6q21.32	Sí	47
hsa-mir-24-2	2,388	3,27	0	MI0000081	19p13.12	Sí	38
microARN regulados negativamente							
Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-218-2	-4,346	0,27	0	MI0000295	5q34	Sí	29
hsa-mir-339	-4,272	0,27	0	MI0000815	7q22.3	Sí	191
hsa-mir-326	-4,037	0,26	0	MI0000808	11q13.4	Sí	148
hsa-mir-34c	-3,525	0,27	0	MI0000743	11q23.1	Sí	94
hsa-mir-152	-3,507	0,31	0	MI0000462	17q21.32	No	59
hsa-mir-138-2	-3,398	0,33	0	MI0000455	16q13	Sí	88
hsa-mir-128a	-3,021	0,33	0	MI0000447	2q21.3	No	51

(a) Puntuación: Valores estadísticos T

(b) valor de q: es la tasa más baja de falsos descubrimiento al que el gen se denomina significativo. Es similar al más familiar "valor p", adaptado al análisis de un gran número de genes.

(c) Sitio activo: indica si la sonda contiene la forma madura del microARN,

(d) Familia microARN, relaciona el microARN basándose en la homología en las regiones flanqueantes de la horquilla como se informa en la base de datos de secuencias mirBase – Realización 7,0

5 Tabla 5. microARN que se expresan diferencialmente entre PET y PACC (FDR: 1 % del percentil 90 y 2 veces)

microARN regulados positivamente							
Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-125a	4,382	4,19	0	MI0000469	19q13.41	Sí	9
hsa-mir-99a	3,711	3,62	0	MI0000101	21q21.1	Sí	17
hsa-mir-99b	3,287	4,25	0	MI0000746	19q13.41	Sí	17
hsa-mir-125b-1	3,271	3,33	0	MI0000446	11q24.1	Sí	9

hsa-mir-342	3,152	3,00	0	MI0000805	14q32.2	Sí	186
hsa-mir-130a	3,101	2,69	0	MI0000448	11q12.1	Sí	50
hsa-mir-100	3,028	2,93	0	MI0000102	11q24.1	Sí	17
hsa-mir-132	2,952	5,44	0	MI0000449	17p13.3	Sí	110
hsa-mir-129-2	2,910	3,86	0	M10000473	11p11.2	Sí	93
hsa-mir-125b-2	2,886	2,94	0	MI0000470	21q21.1	Sí	9

(a) Puntuación: Valores estadísticos T

(b) valor de q: es la tasa más baja de falsos descubrimiento al que el gen se denomina significativo. Es similar al más familiar "valor p", adaptado al análisis de un gran número de genes.

(c) Sitio activo: indica si la sonda contiene la forma madura del microARN,

(d) Familia microARN, relaciona el microARN basándose en la homología en las regiones flanqueantes de la horquilla como se informa en la base de datos de secuencias mirBase – Realización 7,0

Tabla 6. microARN que se expresan diferencialmente entre WDEC y ACC (FDR: 1 % del percentil 90 y dos veces

microARN regulados positivamente

Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-125a	3,785	3,76	0	MI0000469	19q13.41	Sí	9
hsa-mir-99a	3,186	3,65	0	MI0000101	21q21.1	Sí	17
hsa-mir-132	2,969	4,84	0	MI0000449	17p13.3	Sí	110

microARN regulados negativamente

Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-148a	-3,781	0,21	0	MI0000253	7p15.2	Sí	59

(a) Puntuación: Valores estadísticos T

(b) valor de q: es la tasa más baja de falsos descubrimiento al que el gen se denomina significativo. Es similar al más familiar "valor p", adaptado al análisis de un gran número de genes.

(c) Sitio activo: indica si la sonda contiene la forma madura del microARN,

(d) Familia microARN, relaciona el microARN basándose en la homología en las regiones flanqueantes de la horquilla como se informa en la base de datos de secuencias mirBase – Realización 7,0

5 Tabla 7. microARN que se expresan diferencialmente entre Insulinomas y PET no funcionales (FDR: 1 % en el percentil 90 y 2 veces

microARN regulados positivamente

Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-204	5,441	6,07	0	MI0000284	9q21.11	Sí	43
hsa-mir-203	4,079	2,83	0	MI0000283	14q32.11	No	113
hsa-mir-211	3,931	2,81	0	MI0000287	15q13.3	Sí	43

(a) Puntuación: Valores estadísticos T

(b) valor de q: es la tasa más baja de falsos descubrimiento al que el gen se denomina significativo. Es similar al más familiar "valor p", adaptado al análisis de un gran número de genes.

(c) Sitio activo: indica si la sonda contiene la forma madura del microARN,

(d) Familia microARN, relaciona el microARN basándose en la homología en las regiones flanqueantes de la horquilla como se informa en la base de datos de secuencias mirBase – Realización 7,0

Tabla 8. miARN que se expresan diferencialmente entre PET con diferentes parámetros clinicopatológicos. PET con o sin metástasis hepática (FDR: 0 % en el percentil medio y 1,8 veces)
microARN regulado positivamente

Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-21	2,239446173	1,93	0	MI0000077	17q23.2	Sí	61

PET con índice de proliferación alto (Ki67 > 2 %) o bajo (Ki67 ≤ 2 %) (FDR: 0 % en el percentil medio y 1,8 veces)
microARN regulado positivamente

ES 2 524 018 T3

Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-21	2,869445623	1,84	0	MI0000077	17q23.2	Sí	61

PET no funcional con índice de proliferación alto ($Ki67 > 2\%$) o bajo ($Ki67 \leq 2\%$) (FDR: 0 % en el percentil medio y 2 veces
microARN regulado positivamente

Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-21	2,513043962	2,10	0	MI0000077	17q23.2	Sí	61

WDEC con índice de proliferación alto ($Ki67 > 2\%$) o bajo ($Ki67 \leq 2\%$) (FDR: 0 % en el percentil medio y 2 veces
microARN regulado positivamente

Nombre del microARN	Puntuación (a)	Cambio veces	valor de q (b)	ID del registro	Cromosoma	Sitio activo (c)	Familias de microARN (d)
hsa-mir-021	1,642156912	2,32	0	MI0000077	17q23.2	Sí	61

(a) Puntuación: Valores estadísticos T

(b) valor de q: es la tasa más baja de falsos descubrimiento al que el gen se denomina significativo. Es similar al más familiar "valor p", adaptado al análisis de un gran número de genes.

(c) Sitio activo: indica si la sonda contiene la forma madura del microARN,

(d) Familia microARN, relaciona el microARN basándose en la homología en las regiones flanqueantes de la horquilla como se informa en la base de datos de secuencias mirBase – Realización 7,0

Tabla 9. Supuestos genes diana de *miR-204/211* identificados mediante tres métodos de predicción

Símbolo	Núm. Reg.	ID UniGene	Nombre del gen	ID Ensambl. Gené.	ID Gen	Cromosoma
CDH2	NM_001792	Hs.464829	Caderina 2, tipo 1, N-caderina (neuronal)	ENSG00000170558	1000	18q11.2
KHDRBS1	NM_006559	Hs.445893	Dominio que contiene KH, union ARN, asociado a la transucción de 1	ENSG00000121774	10657	1p32
MAPRE2	NM_014268	Hs.532824	Proteína asociada a microtúbulos, familia RP/EB, miembro 2	ENSG00000166974	10982	18q12.1
NCOA7	NM_181782	Hs.171426	Receptor co-activador Nuclear 7	ENSG00000111912	135112	6q22.32
ATF2	NM_001880	Hs.425104	Activating transcription factor 2	ENSG00000115966	1386	2q32
GLIS3	NM_152629	Hs.162125	Familia GLIS dedo de zinc 3	ENSG00000107249	169792	9p24.2
EPHA7	NM_004440	Hs.73962	receptor EPH A7	ENSG00000135333	2045	6q16.1
C10orf56	NM_153367	Hs.523080	10 fase de lectura abierta 56	ENSG00000165424	219654	10q22.3
AP3M1	NM_012095	Hs.500104	Complejo de proteína relacionada con el Adaptor 3, mu subunidad 1	ENSG00000185009	26985	10q22.2
PRO0149	NM_014117	Hs.221497	Proteína PRO0149	ENSG00000182831	29035	16p13.2
NRBF2	NM_030759	Hs.449628	Factor 2 de unión al receptor Nuclear	ENSG00000148572	29982	10q21.3
M11S1	NM_005898	Hs.471818	Componente de membrana, cromosoma 11, marcador de superficie 1	ENSG00000135387	4076	11p13
MYO10	NM_012334	Hs.481720	Miosina X	ENSG00000145555	4651	5p15.1-p14.3
NOVA1	NM_002515	Hs.211225	Antígeno 1 Neuro-oncológico ventral	ENSG00000139910	4857	14q
NTRK2	NM_006180	Hs.494312	Tirosina quinasa neurotrópica, receptor tipo 2	ENSG00000148053	4915	9q22.1
hSyn	NM_018157	Hs.368253	Sinembrina cerebral	ENSG00000111785	55188	12q23.3
HMGGA2	NM_003483	Hs.505924	Grupo de alta movilidad AT-hook 2	ENSG00000149948	8091	12q15
AKAP1	NM_003488	Hs.463506	Proteína quinasa 1 de anclaje A (PRKA)	ENSG00000121057	8165	17q21-q23
OGT	NM_003605	Hs.405410	N-acetilglucosamina O-ligada (GlcNAc) transferasa (UDP-N-acetilglucosamina:pdipéptido-N-acetilglucosaminil transferasa)	ENSG00000147162	8473	Xq13
CCNT2	NM_001241	Hs.292754	Ciclina T2	ENSG00000082258	905	2q21.3

Tabla 10. Supuestos genes diana de *miR-204/211* y *mir-21* que se encuentran diferencialmente expresados

Supuestos genes diana de *miR-204/211* que se encuentran expresados diferencialmente entre NF-PET e insulinomas, La micromatriz EST contiene 16 de los 20 supuestos genes identificados

REGULADO POSITIVAMENTE

Diana génica	Veces	Valor de p
MAPRE2	1,75	0,0070
AP3M1	1,30	0,0330

REGULADO NEGATIVAMENTE

Diana génica	Veces	Valor de p
MYO10	0,43	0,0014
AKAP1	0,59	0,0114

Supuestos genes Diana de *miR-21* que se encuentran diferencialmente expresados entre PET con o sin metástasis, La micromatriz EST contiene 11 de los 12 supuestos genes diana identificados

REGULADO POSITIVAMENTE

Diana génica	Veces	Valor de p
NFIB	1,69	0,038

REGULADO NEGATIVAMENTE

Diana génica	Veces	Valor de p
PDCD4	0,71	0,001

Supuestos genes diana de *miR-21* que se encuentran diferencialmente expresados entre PET alto ($ki67 > 2$) o bajo ($Ki \leq 2$), La micromatriz EST contiene 11 de 12 supuestos genes diana identificados

REGULADO NEGATIVAMENTE

Diana génica	Veces	Valor de p
PDCD4	0,66	0,00001

Un patrón de expresión microARN distingue tumores pancreáticos endocrinos y acinares de páncreas normales

5 La gran mayoría de los microARN expresados diferencialmente encontrados en PACC frente al tejido normal se encontraron también en PET frente a tejido normal. En particular 28 de 39 (93 %) microARN que estaban sobre-expresados en PACC también se encontraban regulados positivamente en PET. De manera similar cinco de siete (un 71 %) microARN que se bajo-expresaban estaban regulados negativamente en ambos subtipos tumorales. Este solapamiento, junto con el hecho de que solamente un grupo limitado de micro ARN se expresaban diferencialmente entre PET y PACC o entre los subtipos PET, sugiere un patrón de expresión microARN común a tumores derivados acinares e insulares.

15 Entre los microARN regulados positivamente en PET que son también comunes a PACC, se validaron siete por análisis de transferencia de Northern. En particular, el *mir-103* era el que mejor discriminaba para todas las comparaciones por pares de páncreas normal, carcinomas celulares acinares y tumores pancreáticos endocrinos (FIG. 2A y 2B). También se confirmó la expresión de *miR-107* que era paralela a su mayor homólogo el *miR-103*, y la sobre-expresión significativa de *miR-23a*, *miR-26b*, *miR-192*, y *miR-342* en tumores frente a normales (FIG. 6A-6C).

20 Entre los microARN regulados negativamente en PET, el análisis de transferencia de Northern de *miR-155* mostró la falta de expresión detectable tanto en PET y PACC (FIG. 2A y 2B). Aunque *miR-155* no estaba entre los genes regulados negativamente más enumerados en PACC (Tabla 4), su baja expresión en este tipo tumoral se detectó también por micromatrices, como se muestra en el gráfico de caja y bigotes de la FIG. 2A.

25 *Un grupo limitado de microARN distingue tumores pancreáticos endocrinos de tumores acinares.*

30 La comparación directa de PET y PACC mostraba solamente 10 microARN regulados positivamente (Tabla 5), todos los cuales estaban también sobre-expresados en PET frente al tejido normal. Por el contrario, no se encontró ningún microARN que estuviera regulado positivamente o negativamente específicamente en PACC.

Sobre-expresión de miR-204 específica de insulinoma y se correlaciona con la expresión inmunohistoquímica de insulina.

La comparación de insulinomas con NF-PET identificaba solo tres microARN que estaban sobre-expresados significativamente en los insulinomas, incluyendo el *miR-204*, su homólogo *miR-211*, y *miR-203* (Tabla 7). Particularmente, la expresión de proteína insulina, que se detectaba por tinción inmunohistoquímica, se correlacionaba con la expresión de *miR-204* más fuertemente que con la expresión de ARNm de insulina (FIG. 3A-3C). De hecho, los análisis de regresión logística, basados en la tinción ICH positiva o negativa, mostraba que se predecía la expresión de proteína insulina por el ARNm de insulina y la expresión de *miR-204* ($p < 0,001$); sin embargo en un modelo multivariado, solamente la expresión de *miR-204* mantenía la significación estadística ($p < 0,001$).

Como se sugirió que el *miR-375* se expresaba específicamente en los islotes pancreáticos del ratón y que funcionaba como un regulador negativo de la exocitosis de insulina (Poy, M.N., y col., Nature 432:226-30 (2004)), los inventores investigaron su expresión en tejidos normales humanos y sus muestras, por transferencia de Northern. Utilizando un panel de varios tejidos de seres humanos adultos, solamente se detectó el *miR-375* en páncreas normales (FIG. 7A). Los niveles de expresión de *miR-375* generalmente eran más altos en tumores frente a páncreas normales, pero no mostraban diferencias entre los insulinomas y los tumores no funcionales (FIG. 7B y 7C).

La expresión de miR-21 se asocia fuertemente con el índice de proliferación y la presencia de metástasis hepática.

La evaluación de los perfiles de expresión para identificar los microARN que discriminan PET basándose en su estado metastático o el índice de proliferación identificaban solamente al *miR-21* como significativo (FIG. 4A-4C y Tabla 8). Esto no es sorprendente, dado que estos dos características tumorales están interconectadas. De hecho, todos los PET metastáticos tenían un índice de proliferación $>2\%$, mientras que ningún tumor con una puntuación de proliferación menor era metastático. Además, el *miR-21* también distinguía entre NF-PET o WDEC con índice de proliferación alto ($Ki > 2\%$) y bajo ($Ki \leq 2\%$). Otra observación interesante es que el *miR-21* también se sobre-expresaba en PACC frente a páncreas normal (Tabla 4).

Identificación de supuestas dianas ARNm para los microARN expresados diferencialmente

Se utilizaron tres programas diferentes (miRanda, TargetScan, PicTar, disponibles respectivamente en www.microrna.org/mammalian/index.html; www.genes.mit.edu/targetscan/; y www.pictar.bio.nyu.edu) para identificar dianas previstas de los microARN seleccionados, a saber *miR-103/miR-107*, *miR-155*, *miR-204/miR-211* y *miR-21*. Para aumentar la rigurosidad del análisis, los inventores consideraron solo los genes diana que se encontraban en los tres algoritmos (Tabla 9). Ya que se había analizado la expresión de microARN en las mismas muestras tumorales y cinco páncreas normales y también se habían evaluado en cuanto a los perfiles de expresión con una micromatriz a medida EST (datos no mostrados), los inventores intentaron evaluar el estado de las dianas ARNm previstas en PET y tejido normal, así como entre PET con diferentes características clinicopatológicas. Un análisis t de dos muestras identificó varios supuestos genes diana que estaban o regulados negativamente o regulados positivamente, concretamente 28 genes regulados positivamente y 7 regulados negativamente para *miR-103/107*, 2 genes regulados positivamente y 2 regulados negativamente para *miR-155* o *miR-204/211*, y 1 gen regulado positivamente y 1 gen regulado negativamente para *miR-21* (Tabla 10). Particularmente, la expresión del ARNm del gen *PDCD4*, una supuesta diana de *miR-21*, se encontró que estaba regulado negativamente en PET con metástasis hepática, así como en tumores con índice alto de proliferación, mostrando una correlación inversa con la expresión de *miR-21* (FIG. 5).

Conclusión

Los resultados de la evaluación de los perfiles de expresión de microARN en páncreas normal, tumores pancreáticos endocrinos y carcinomas acinares se puede resumir de la siguiente manera:

- i) un perfil de expresión de microARN común distingue entre tumores endocrinos y acinares de páncreas normal;
- ii) la expresión de *miR-103* y *miR-107* asociada con la falta de expresión de *miR-155* discrimina tumores de normales;
- iii) un grupo limitado de microARN es específico de tumores endocrinos y está asociado posiblemente con diferenciación endocrina y tumorigénesis;
- iv) se produce expresión de *miR-204* primariamente en insulinomas y se correlaciona con la expresión inmunohistoquímica de insulina; y
- v) la expresión de *miR-21* se asocia fuertemente con el índice de proliferación y la metástasis hepática.

El agrupamiento jerárquico no supervisado de los perfiles de expresión mostraba que ambos tipos tumorales se separaban del páncreas normal. Aunque el PACC se encontraba en un único grupo, era parte de un grupo más amplio que incluía todos los PET. Aunque los inventores identifican muchos más microARN expresados diferencialmente en PET frente a normales que entre carcinomas acinares frente a normales, la gran mayoría de los microARN expresados diferencialmente en PACC estaban alterados de manera similar en PET. Vale la pena señalar que la masa pancreática está formada en su mayoría por acini y por lo tanto representa el equivalente ideal normal para el análisis de los carcinomas celulares acinares, mientras que las células de los islotes pancreáticos

representarían el equivalente normal para los tumores pancreáticos endocrinos. Desafortunadamente, los inventores no tenían preparaciones disponibles de esas células. Sin embargo, el hallazgo de un patrón ampliamente concordante de microARN expresados diferencialmente entre tumores acinares e insulares, incluyendo 28 genes regulados positivamente y 5 regulados negativamente, sugieren que este grupo común de ambos tipos tumorales puede estar relacionado con la transformación pancreática neoplásica. Para proporcionar un soporte adicional a esta afirmación, se han encontrado varios microARN expresados diferencialmente en ambos tipos tumorales que se expresan diferencialmente en mama, colon y leucemia de células B (Caldas, C., y col., Nat. Med. 11:712-14 (2005); Croce, C.M., y G.A. Calin, Cell 122:6-7 (2005); Iorio, M.V., y col., Cancer Res. 65:7065-70 (2005)). Además, se ha identificado que al menos veinte de los microARN expresados diferencialmente en los tumores de la invención tienen efectos relacionados con el crecimiento y efectos apoptóticos en las líneas celulares A549 de pulmón y Hela de carcinoma de cuello uterino (Cheng, A.M., y col., Nucleic Acids Res. 33:1290-97 (2005)).

Además, los inventores observaron, en PACC y PET, la sobre-expresión coordinada de *miR-17*, *miR-20* y *miR-92-1*, que están contenidos en un grupo policistrónico. Este grupo *miR-17-92* se ha descrito que actúa como un oncogén en asociación con el gen *c-MYC* (He, L., y col., Nature 435:828-33 (2005)). Particularmente, la sobre expresión de *c-MYC* se ha informado en los tumores pancreáticos endocrino y también en islotes hiperplásicos, lo que sugiere su implicación en las fases tempranas de la tumorigénesis insular (Pavelic, K., y col., Anticancer Res. 16:1707-17 (1996)). Además, la inducción de *MYC* en las células de los islotes o acinares de ratón en modelos *in vitro* e *in vivo* produce tumores endocrinos (Katic, M., y col., Carcinogenesis 20:1521-27 (1999); Lewis, B.C., y col., Genes Dev. 17:3127-38 (2003)) o adenocarcinomas mixtos acinares/ductales (Sandgren, E.P., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:93-97 (1991), respectivamente, mientras que la supresión de apoptosis inducida por *MYC* da lugar a carcinoma de células de los islotes (Pelengaris, S., y col., Cell 109:321-34 (2002)).

La expresión de los dos microARN altamente homólogos *miR-103* y *miR-107* junto con la falta de expresión de *miR-155* eran distintivos de tumores frente a muestras pancreáticas normales. Resulta interesante que se han encontrado *miR-103/miR-107* sobre-expresados en varios tipos tumorales. El hallazgo de que *miR-155* se expresaba en páncreas normal pero estaba bajo-expresado o no se expresaba en PET y PACC es bastante interesante considerando que se ha observado sobre-expresión de *miR-155* en linfomas (Caldas, C., y col., Nat. Med. 11:712-14 (2005); Croce, C.M., and G.A. Calin, Cell 122:6-7 (2005)) y cáncer de mama (Iorio, M.V., y col., Cancer Res. 65:7065-70 (2005)), un hallazgo que ha dado lugar a la especulación de que *miR-155* puede ser un microARN oncogénico (Croce, C.M., y G.A. Calin, Cell 122:6-7 (2005)). Esto puede que no sea inesperado, ya que los microARN expresados en adultos son específicos del tejido (Babak, T., y col., RNA 10:1813-19 (2004)) y las consecuencias de la mala expresión de microARN son altamente dependientes del patrón de expresión celular específico de ARNm que están regulados por microARN (Cheng, A.M., y col., Nucleic Acids Res. 33:1290-97 (2005)).

Se sobre-expresaban diez microARN peculiarmente en PET y diferenciaban este tumor tanto de PACC, como de páncreas normal. Estos incluyen *miR-99a*, *miR-99b*, *miR-100*, *miR-125a*, *miR-125b-1*, *miR-125b-2*, *miR-129-2*, *miR-130a*, *miR-132*, y *miR-342*. Estos microARN pueden ser característicos de diferenciación endocrina o tumorigénesis endocrina. Por otra parte, no se encontró ningún microARN que esté regulado positivamente o negativamente específicamente en PACC, aunque el número limitado de muestras de PACC puede haber afectado la fuerza del análisis.

Aunque los perfiles de microARN eran casi indistinguibles entre insulinomas y tumores endocrinos no funcionales, la sobre-expresión de los dos microARN estrechamente relacionados, o sea *miR-204* y *miR-211*, estaba sobre todo restringida a los insulinomas. Resulta de gran interés que la expresión de *miR-204* se correlaciona con la expresión inmunohistoquímica de insulina. A este respecto, se ha informado recientemente que el *miR-375* se expresa específicamente en islotes pancreáticos de ratón y que funciona como un regulador negativo de la exocitosis de insulina (Poy, M.N., y col., Nature 432:226-30 (2004)). Los datos de la invención muestran que este microARN se expresa en páncreas normal humano, así como en tumores endocrino y celular acinar. Sin embargo, no se ha encontrado una diferencia en su nivel de expresión entre insulinomas y tumores endocrinos no funcionales.

Los inventores también han determinado si la expresión de microARN se correlacionaba con las características clínicas del PET. Los resultados de la invención muestran que la sobre-expresión de *miR-21* se asocia con aumento del índice Ki67 de proliferación y metástasis hepática. Se ha observado sobre-expresión de *miR-21* en varios cánceres, incluyendo glioblastoma, cánceres de mama, pulmón, y colon (Caldas, C., y col., Nat. Med. 11:712-14 (2005); Croce, C.M., y G.A. Calin, Cell 122:6-7 (2005)). Una función de *miR-21* relacionada con el cáncer también está apoyada por los experimentos knockdown en líneas celulares de glioblastoma mostrando que este microARN tiene una función anti-apoptótica (Chan, J.A., y col., Cancer Res. 65:6029-33 (2005)). A este respecto, se encontró que el gen de muerte programada 4 (*PDCD4*), al que supuestamente se dirige el *miR-21*, estaba regulado negativamente significativamente en muestras de PET altamente proliferativos y metastáticos, y mostraba una correlación inversa con la expresión de *miR-21*. Se ha informado que este gen actúa como un supresor tumoral por medio de la activación de p21^{waf1} y la inhibición del complejo del factor de transcripción AP-1; este último controla genes que se han implicado en la invasión celular y la progresión metastática (Jansen, A.P., y col., Mol. Cancer Ther. 3:103-10 (2004)). Además, la expresión de *PDCD4* se pierde en carcinomas avanzados de pulmón, mama, colon, y cáncer de próstata (Goke, R., y col., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 287:C1541-46 (2004)), y particularmente,

se ha informado también de un papel supresor tumoral para *PDCD4* en un modelo de células de tumor neuroendocrino (Goke, R., y col., Ann. N.Y. Acad Sci. 1014:220-21 (2004)).

5 Los microARN expresados diferencialmente en PET mostraban una distribución no aleatoria entre los brazos cromosómicos y la mayoría de los microARN localizados en los brazos cromosómicos 5q, 7q, 13q y 19p estaban sobre-expresados. Este hallazgo puede ser debido a la asociación frecuente de microARN en grupos policistrónicos (Baskerville, S. y D.P. Bartel, RNA 11:241-47 (2005); Altuvia, Y., y col., Nucleic Acids Res. 33:2697-2706 (2005)) o a la amplificación de los brazos cromosómicos que contienen estos microARN. Los análisis de los inventores sugieren que ambos fenómenos pueden estar implicados en PET. De hecho, los coeficientes de correlación medidos entre
10 pares de microARN en los grupos diferían significativamente de los de entre pares de microARN fuera de los grupos. Estos datos confirman la observación general en PET de que el agrupamiento de genes microARN presentan una expresión coordinada (Baskerville, S. y D.P. Bartel, RNA 11:241-47 (2005); Altuvia, Y., y col., Nucleic Acids Res. 33:2697-2706 (2005)).

15 Los microARN ejercen sus efectos biológicos dirigiéndose a ARNm específicos para la degradación o inhibición de la traducción. Con el fin de tener una visión de las implicaciones biológicas de los microARN más interesantes que muestran expresión alterada en tumores pancreáticos, por ejemplo, *miR-103/miR-107*, *miR-155*, *miR-204/miR-211* y *miR-21*, los inventores buscaron dianas previstas que estos tenían en común identificándolas por tres algoritmos diferentes (véase Resultados). Luego, para evaluar si había una correlación entre la expresión de microARN y la de
20 sus dianas previstas, los inventores aprovecharon los perfiles de expresión EST del mismo tumor y muestras normales. Entre las dianas seleccionadas que estaban contenidas en la micromatriz EST, se encontraron varios genes regulados positiva y negativamente. Resulta interesante que los genes diana previstos de *miR-103/107* estaban sobre-expresados más frecuentemente de lo esperado. Estos hallazgos paralelos de Babak y col., que comunicó una baja correlación entre la expresión de microARN y sus dianas ARNm previstas en un grupo de 17
25 tejidos diferentes de ratón (Babak, T., y col., RNA 10:1813-19 (2004)). Esto apoya el modelo preferido actualmente de que la mayoría de los microARN actúan más probablemente por medio de la inhibición de la traducción sin degradación del ARNm (Bartel, D.P., Cell 116:281-97 (2004)).

30 En conclusión, los resultados descritos en el presente documento sugieren que la alteración de la expresión de microARN se relaciona con la transformación neoplásica endocrina y acinar y la progresión en malignidad.

Aunque esta invención se ha mostrado particularmente y se ha descrito con referencias a realizaciones preferidas de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer varios cambios en la forma y detalles de la misma sin alejarse del ámbito de la invención que se incluye en las reivindicaciones adjuntas.
35

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer pancreático, que comprende la medición del nivel de al menos un producto génico miR en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en donde:

5 el producto génico miR se asocia con un pronóstico adverso en el cáncer pancreático; y un aumento en el nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativo de un pronóstico adverso en donde el al menos un producto génico miR es miR-21.

10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer pancreático se asocia con metástasis y/o un índice alto de proliferación.

15 3. Un método para determinar si un cáncer pancreático de un sujeto es metastático, que comprende la medición del nivel de al menos el producto génico miR-21 en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en donde:

20 el producto génico miR se asocia con metástasis; y un aumento del nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra de control, es indicativo de metástasis.

25 4. Un método para determinar si un cáncer pancreático de un sujeto tiene un índice alto de proliferación, que comprende la medición del nivel de al menos un producto génico miR-21 en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en donde:

el producto génico miR está asociado con un índice alto de proliferación; y un aumento del nivel del al menos un producto génico miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en la muestra de control, es indicativo de un índice alto de proliferación.

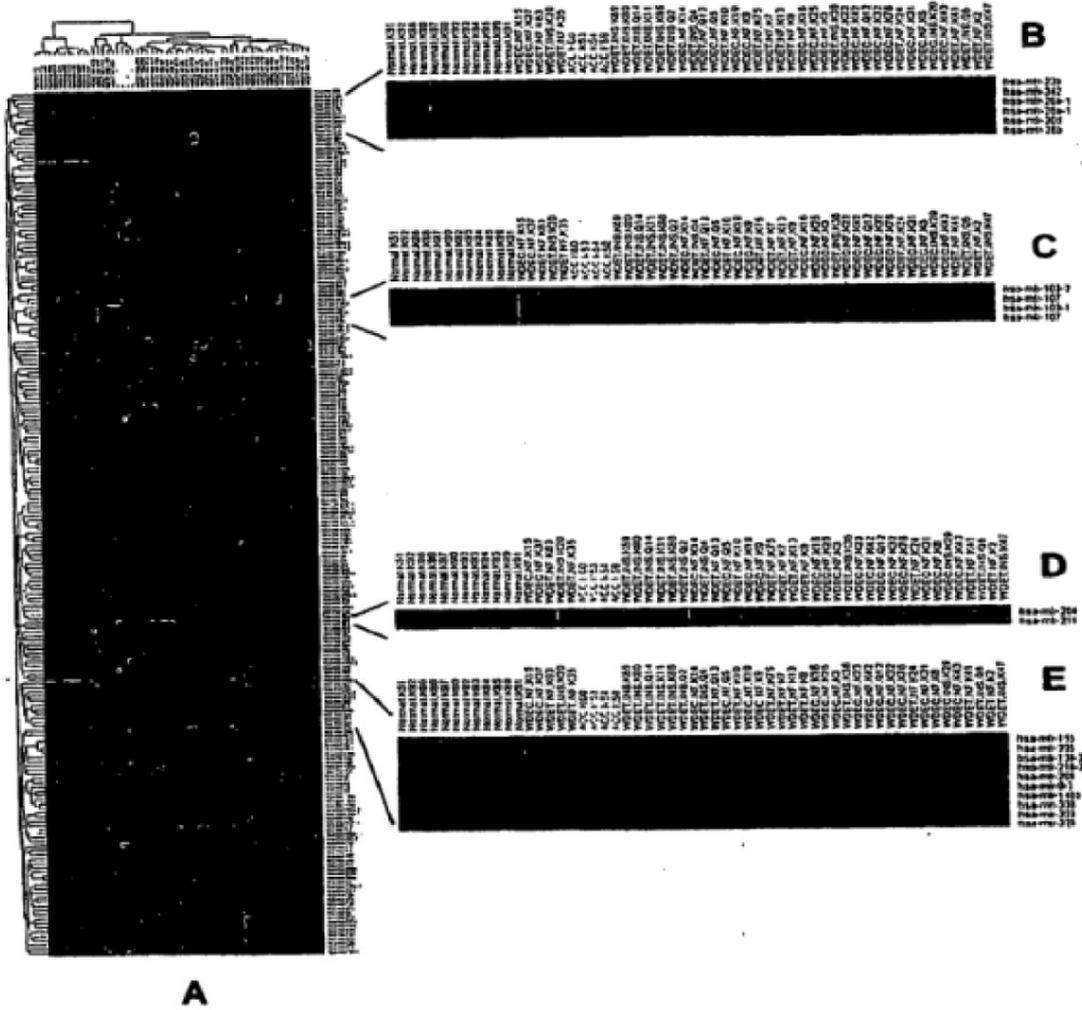
30 5. Un método para diagnosticar si un sujeto tiene un cáncer pancreático con un pronóstico adverso, que comprende:

- 35 (1) la transcripción inversa de ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana;
(2) la hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para dicha muestra de ensayo; y
(3) la comparación del perfil de hibridación de la muestra de ensayo con el perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control.

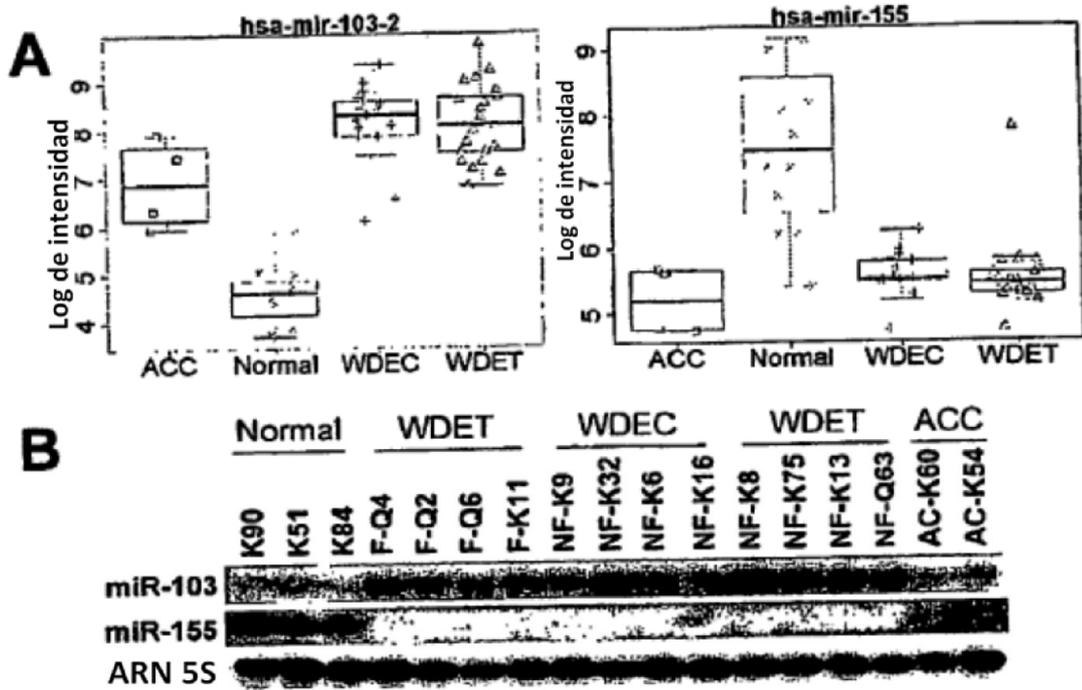
40 en donde un incremento en la señal de miR-21 es indicativo de que el sujeto tiene un cáncer pancreático con un pronóstico adverso.

45 6. Un método para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer pancreático, que comprende la medición del nivel de PDCD4 en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en donde una disminución del nivel de PDCD4 en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de PDCD4 en una muestra de control, es indicativa de un pronóstico adverso.

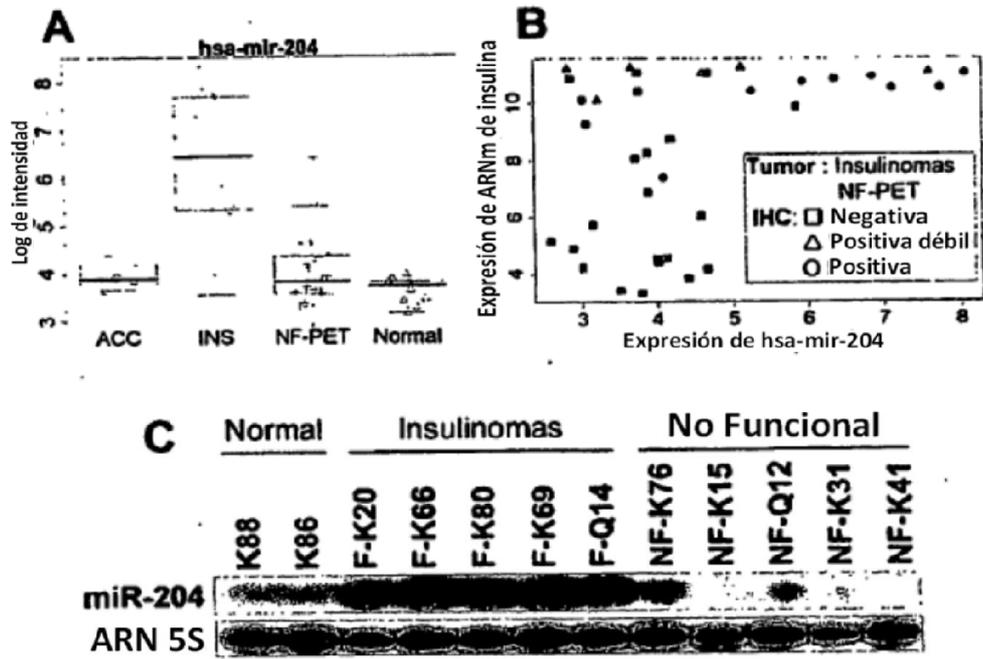
7. El método de la reivindicación 6, en donde el cáncer pancreático se asocia con metástasis y/o un índice alto de proliferación.



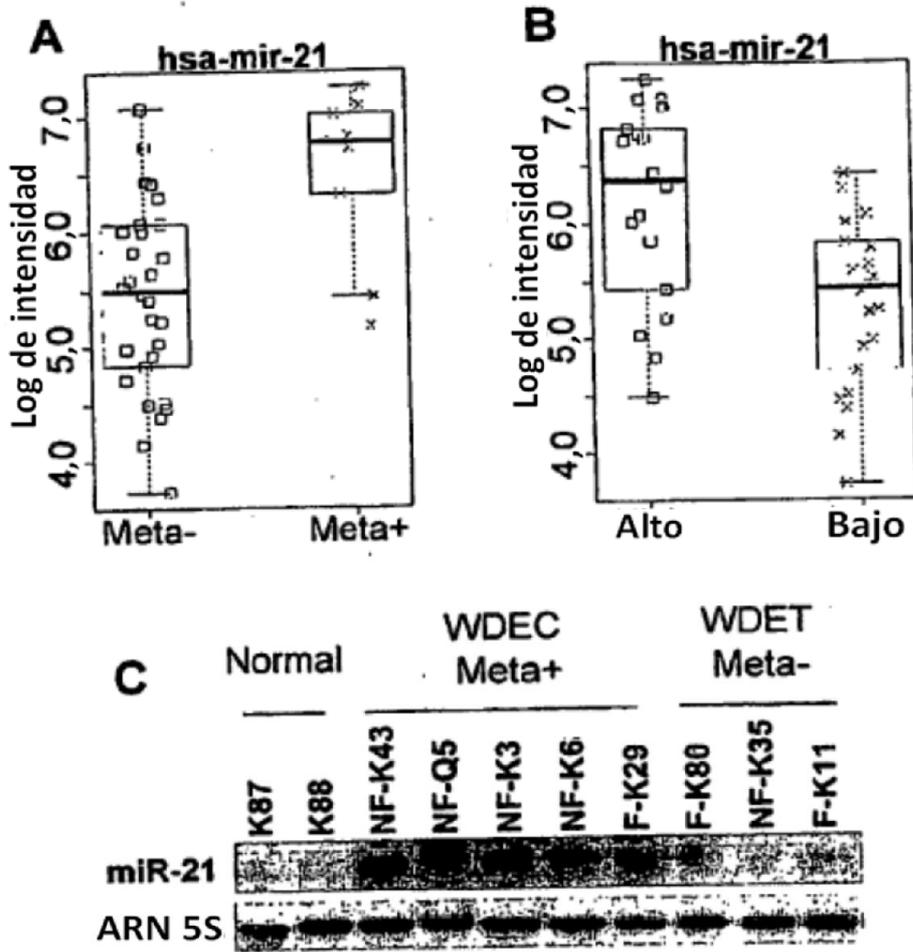
FIGURAS 1A-1E



FIGURAS 2A y 2B



FIGURAS 3A-3C



FIGURAS 4A-4C

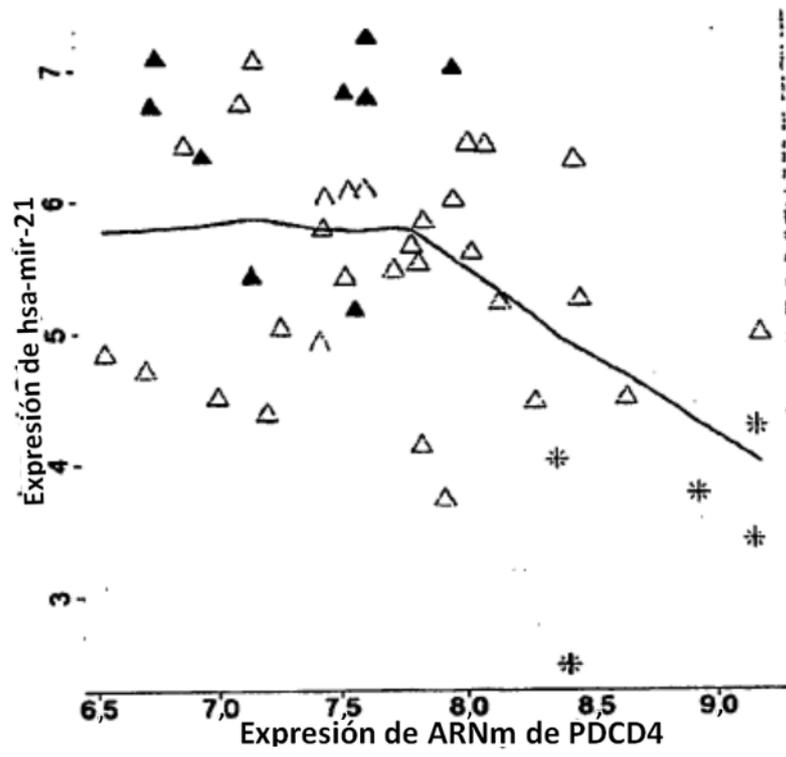
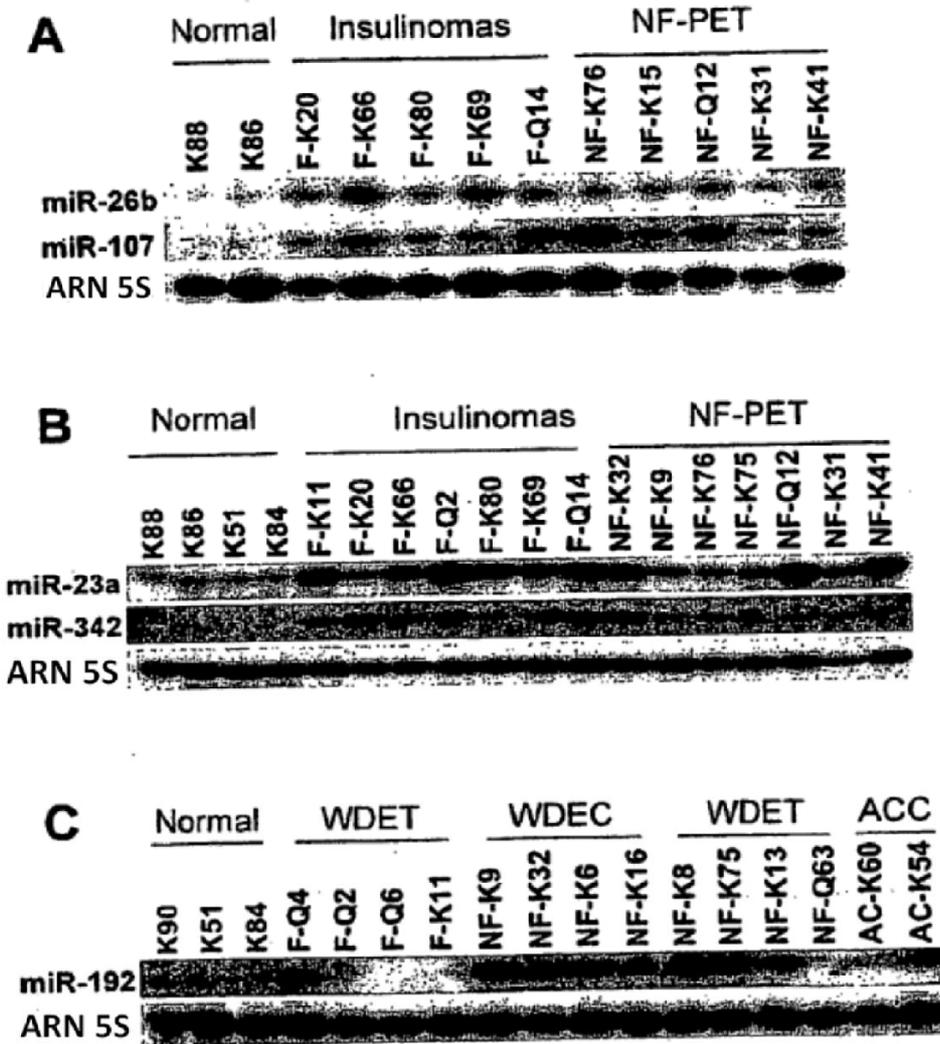
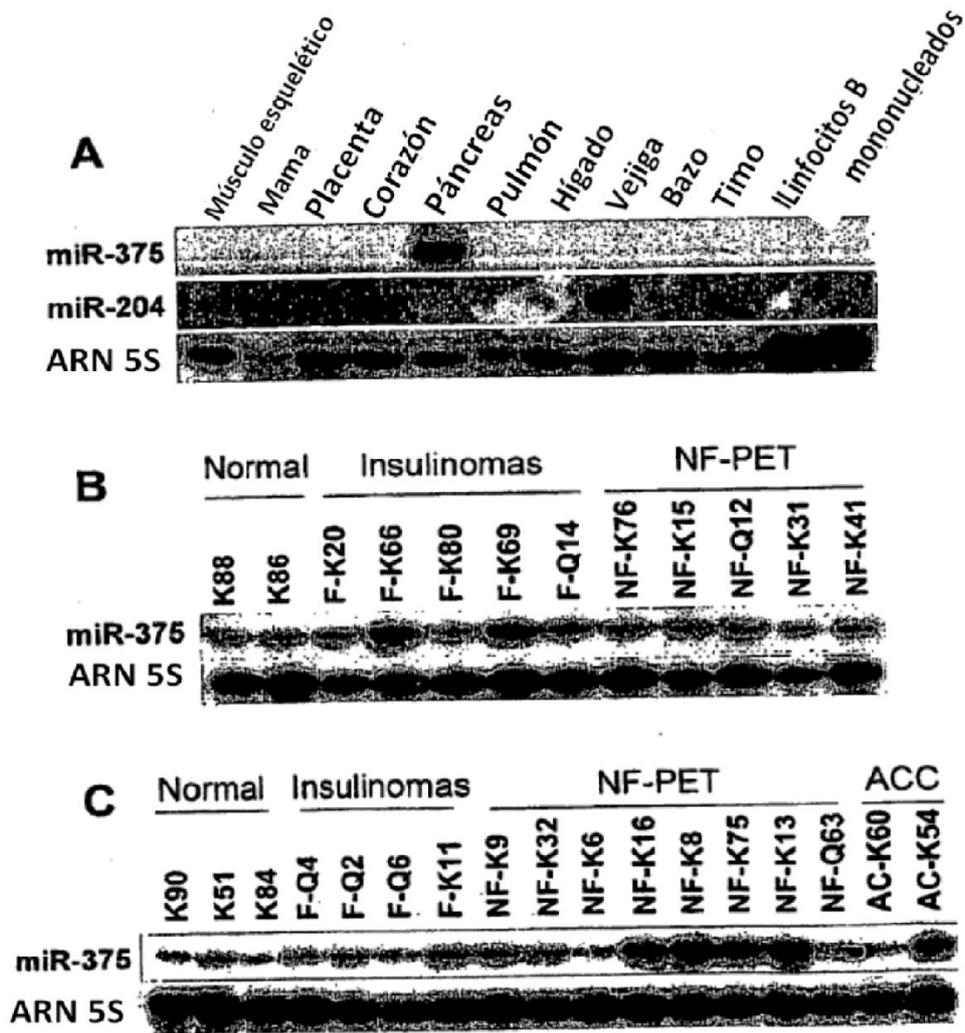


FIG. 5



FIGURAS 6A-6C



FIGURAS 7A-7C