

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 349**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2008 E 12179592 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2559772**

54 Título: **Métodos para determinar un subtipo de carcinoma hepatocelular**

30 Prioridad:

**08.06.2007 US 942833 P**

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

**05.06.2015**

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (50.0%)  
National Institutes of Health Office of Technology Transfer 6011 Executive Boulevard, Suite 325  
Rockville, MD 20852-3804, US y  
THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WANG, XIN WEI;  
JI, JUNFANG;  
YAMASHITA, TARO y  
CROCE, CARLO M.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 537 349 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para determinar el subtipo de un carcinoma hepatocelular

5 **Antecedentes de la invención**

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la tercera causa más importante de muerte por cáncer alrededor del mundo. El CHC es muy heterogéneo en términos de su presentación clínica y patrones genómicos y transcriptómicos. La heterogeneidad en CHC y la falta de biomarcadores apropiados para su detección e identificación de subtipo han obstaculizado el pronóstico de los pacientes y la estratificación del tratamiento.

Por consiguiente, existe un deseo de uno o más biomarcadores que puedan identificar el subtipo de CHC en un mamífero, así como de métodos para proporcionar un tratamiento apropiado basándose en el subtipo de CHC. MURAKAMI Y *et al.*: "Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues", *Oncogene*, nature Publishing group, RU Vol. 25, Nº. 17, 1 de Abril de 2006, páginas 2537-2545 se refiere a la identificación de marcadores biológicos para una "mejor detección del CHC" En este estudio se examinaron las expresiones de los miARN en especímenes de CHC en comparación con los especímenes no tumorales adyacentes, y se descubrieron 30 genes de miARN que se expresaron de forma significativamente diferencial en el CHC y los tejidos no tumorales correspondientes.

20 **Breve resumen de la invención**

La presente divulgación proporciona un método para determinar el subtipo de CHC en el sujeto, comprendiendo el método a) obtener una muestra del sujeto, b) ensayar la muestra para detectar al menos 1 biomarcador y c) correlacionar los biomarcadores detectados con un subtipo de CHC en el sujeto. A este respecto, los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en los biomarcadores identificados por las SEC ID Nº: 1-39.

La presente divulgación también proporciona un método de detección de una célula madre de CHC en una muestra. En una realización el método de la invención comprende a) obtener una muestra, b) ensayar la muestra para detectar la presencia de un biomarcador mir-181, y c) correlacionar la presencia o ausencia del biomarcador mir-181 con la presencia o ausencia de la célula madre de CHC en la muestra.

La presente divulgación también proporciona métodos y composiciones para tratar a sujetos con CHC que aprovechan los biomarcadores asociados con células madre de CHC.

35 **Breve descripción de las distintas vistas de las figuras**

La Figura 1A muestra la expresión de mir-181a1 en una relación log(2) (de tejido tumoral respecto a no tumoral) en células HSC-CHC basándose en el análisis de micro ARN.

La Figura 1B muestra la expresión de mir-181a2 en una relación log(2) (de tejido tumoral respecto a no tumoral) en células de HSC, DBE, HP, y MH-CHC basándose en el análisis de micro ARN.

La Figura 1C muestra la expresión de mir-181b1 en una relación log(2) (de tejido tumoral respecto a no tumoral) en células HSC, DBE, HP, y MH-CHC basándose en el análisis de micro ARN.

La Figura 1D muestra la expresión de mir-181b2 en una relación log(2) (de tejido tumoral respecto a no tumoral) en células HSC, DBE, HP, y MH-CHC basándose en el análisis de micro ARN.

La Figura 1E muestra la expresión de mir-181 c en una relación log(2) (de tejido tumoral respecto a no tumoral) en células HSC, DBE, HP, y MH-HCC basándose en el análisis de micro ARN.

La Figura 1F muestra la expresión de mir-181a en una relación log(2) (de tejido tumoral respecto a no tumoral) en células HSC, DBE, HP, y MH-HCC como se determina por RT-PCR.

La Figura 1G muestra la expresión de mir-181b en una relación log(2) (de tejido tumoral respecto a no tumoral) en células HSC, DBE, HP, y MH-CHC como se determina por RT-PCR.

La Figura 1H muestra la expresión de mir-181 c en una relación log(2) (de tejido tumoral respecto a no tumoral) en células HSC, DBE, HP, y MH-CHC tal como se determina por RT-PCR.

La Figura 1I muestra la expresión de mir-181d en una relación log(2) (de tejido tumoral respecto a no tumoral) en células HSC, DBE, HP, y MH-CHC tal como se determina por RT-PCR.

La Figura 1J muestra la expresión de mir-213 en una relación log(2) (de tejido tumoral respecto a no tumoral) en células HSC, DBE, HP, y MH-CHC tal como se determina por RT-PCR.

La Figura 2A muestra una gráfica de dispersión de mir-181a1.

La Figura 2B muestra una gráfica de dispersión de mir-181a2.

La Figura 2C muestra una gráfica de dispersión de mir-181b1.

La Figura 2D muestra una gráfica de dispersión de mir-181b2.

La Figura 2E muestra una gráfica de dispersión de mir-181 c.

La Figura 3A una gráfica que muestra la multiplicidad de producción de mir-181a, mir-181b, mir-181c y mir-181d a 0, 2 y 8 días en medio ESC frente a cultivo regular.

La Figura 3B es una gráfica que muestra la multiplicidad de CAR y UGT2B7 a 0, 2 y 8 días en medio ESC frente a cultivo regular.

La Figura 3C es una gráfica que muestra la multiplicidad de producción de CCND1 y TACSTD1 a 0, 2 y 8 días en medio ESC frente a cultivo regular.

La Figura 3D es una gráfica que muestra la multiplicidad de producción de mir-181a, mir-181b, mir-181c y mir-181d a 0, 1, 2 y 8 días después de la retirada del medio ESC.

5 La Figura 3E es una gráfica que muestra la multiplicidad de producción de CAR y UGT2B7 a 0, 1, 2 y 8 días después de la retirada del medio ESC.

La Figura 3F es una gráfica que muestra la multiplicidad de producción de CCND1 y TCSTD1 a 0, 1, 2 y 8 días después de la retirada del medio ESC.

10 La Figura 4 es una gráfica de la expresión relativa de mir-181b en células HuH1 tratadas con pMSCV-hTR y pMSCV-mir-181b1.

La Figura 5 es una gráfica de la expresión relativa de mir-181 s en células HuH7 transfectadas con antisentido 2'-O-metil frente a control.

La Figura 6A es una gráfica de la expresión relativa de CCND1 en células HuH1 tratadas con pMSCV-hTR y pMSCV-mir-181b1.

15 La Figura 6B es una gráfica de la expresión relativa de TACTD1 en células HuH1 tratadas con pMSCV-hTR y pMSCV-mir-181b1.

La Figura 6C es una gráfica de la expresión relativa de DKK1 en células HuH1 tratadas con pMSCV-hTR y pMSCV-mir-181b1.

20 La Figura 6D es una gráfica de la expresión relativa de CCND1 en células HuH7 tratadas con control y antisentido.

La Figura 6E es una gráfica de la expresión relativa de TACSTD1 en células HuH7 tratadas con control y antisentido.

La Figura 6F es una gráfica de la expresión relativa de DKK1 en células HuH7 tratadas con control y antisentido.

25 La Figura 7A muestra los sitios de unión predichos de mir-181a, mir-181b, mir-181c y mir-181d al 3'-UTR 611-632 de DKK1.

La Figura 7B muestra los sitios de unión predichos de mir-181a, mir-181b, mir-181c y mir-181d al 3'-UTR 771-799 de DKK1.

La Figura 8A es un sitio de unión predicho a TCF-4 para mir-181 a1 y mir-181b1.

La Figura 8B es un sitio de unión predicho a TCF-4 para mir-181a2 y mir-181b2.

30 La Figura 8C es un sitio de unión predicho a TCF-4 para mir-181c y mir-181d.

La Figura 8D es otro sitio de unión predicho a TCF-4 para mir-181c y mir-181d

[o 41] la Figura 9 es una gráfica de la multiplicidad de mir-181a, mir-181b, mir-181c, y mir-181d en cada línea celular (Hep3b tipo B (HSC-CHC), MHCC97 tipo C (HP-CHC), Smmc7721 tipo D (MH-CHC)) frente a hepatocitos primarios.

35 La Figura 10 es una gráfica del número de miARN con expresión aumentada y disminuida en los subtipos HSC-CHC, BDE-CHC, HP-CHC y MH-CHC.

### Descripción detallada de la invención

40 Los micro ARN (o miARN) son productos génicos de ARN pequeños no codificantes (por ejemplo, ~22 nt) que existen en numerosos organismos y juegan papeles reguladores importantes en la traducción del ARNm y la degradación mediante la formación de pares de bases con sitios parcialmente complementarios del ARNm, predominantemente en la región 3' no traducida. Lee, Science, 294(5543):862-864 (2001); Lau, Science, 294(5543):858-862 (2001); Lagos, Science, 294(5543):853-858 (2001). Los miARN se expresan como precursores de ARN largos que se procesan por Drosha, una nucleasa celular, y posteriormente se transportan al citoplasma por un mecanismo dependiente de Exportina 5. Yi, Genes Dev, 17(24):3011-3016 (2003); Gregory, Cancer Res., 65(9):3509-3512 (2005). Después, la enzima DICER escinde los miARN, dando como resultado miARN de aproximadamente 17-24 nt que se asocian con un complejo de tipo silenciamiento inducido por ARN. Lee, EMBO J, 21(17):4663-4670 (2002); Hutvagner, Science, 297(5589):2056-2060 (2002).

50 El estudio se basa en el hallazgo de que los biomarcadores de miARN se asocian con subtipos de CHC. Para los fines de la invención, los subtipos de CHC de la invención se refieren a CHC de tipo células madre hepáticas (HSC-CHC), que son moléculas de adhesión a células epiteliales (EpCAM)+ alfa-fetoproteína (AFP)+; CHC de tipo epitelio de conducto biliar (BDE-CHC), que es EpCAM+ AFP-; CHC de tipo progenitores de hepatocitos (HP-CHC), que es EpCAM- AFP+; y CHC de tipo hepatocitos maduros (MH-CHC), que es EpCAM- AFP-. La invención proporciona un conjunto de biomarcadores útiles para identificar cada subtipo de CHC.

60 En una realización, la presente divulgación proporciona un método para determinar el subtipo de CHC en un sujeto que comprende a) obtener una muestra del sujeto, b) analizar la muestra para la expresión de 1 o más biomarcadores, y c) correlacionar la expresión del uno o más biomarcadores con el subtipo de CHC en el sujeto. La expresión de los biomarcadores puede estar disminuida o aumentada respecto al control normal. Los biomarcadores se identifican por las SEC ID N°: 1-39 (véase la Tabla 1). En el método inventivo, es preferente que se analicen 2 o más, 5 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 25 o más, 30 o más, o 35 o más biomarcadores. Más preferentemente, se analizan los 39 biomarcadores. Para la determinación del subtipo HSC-CHC, preferentemente se analizan al menos los biomarcadores identificados por las SEC ID N°: 1-19. Para la determinación del subtipo BDE-CHC, preferentemente se analizan al menos los biomarcadores identificados por las SEC ID N°: 2, 9-17, y 19-

35. Para la determinación del subtipo HP-CHC, preferentemente se analizan al menos los biomarcadores identificados por las SEC ID N°: 1-8, 11-13, 17-18, 23, 28-29 y 33-39. Para la determinación del subtipo MH-CHC, preferentemente se analizan al menos los biomarcadores identificados por las SEC ID N°: 1, 8-12, 14-17 y 19-39.

5 Además, se ha descubierto que a diferencia de las células hepáticas maduras, las células madre de CHC se asocian con (es decir, expresan) biomarcadores de miARN de la familia mir-181, particularmente mir-181a1, mir-181a2, mir-181b1, mir-181b2 y mir-181c, y que la presencia de células madre de CHC en una muestra es indicativa del subtipo HSC-CHC, que se asocia con mal pronóstico. Por consiguiente, en una realización, la presente divulgación  
10 proporciona un método para detectar la presencia de células madre de CHC en una muestra que comprende a) obtener una muestra, b) ensayar la muestra para detectar la presencia de un biomarcador mir-181, y c) correlacionar la presencia o ausencia del biomarcador mir-181 con la presencia o ausencia de la célula madre de CHC en la muestra. Por ejemplo, como alternativa, las células madre de CHC EpCAM+AFP+ se pueden detectar por cualquier método adecuado, por ejemplo, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, separación celular activada por congelación, métodos de población lateral, métodos de detección de los marcadores de superficie celular o hibridación *in situ*. Por ejemplo, en la técnica de población lateral, se carga el colorante de unión a ADN permeable  
15 para células Hoechst 33342 dentro de la población celular de interés; las células madre y progenitores tempranos posteriormente bombean al exterior este colorante por medio de un mecanismo dependiente de la bomba de membrana del casete de unión a ATP, dando como resultado una "cola" de baja fluorescencia cuando las células se analizan por citometría de flujo. En una realización, el método además comprende correlacionar la presencia de la célula madre de CHC en la muestra con la presencia del subtipo HSC-CHC en la muestra. Ventajosamente, la detección de células madre de CHC en una muestra puede permitir la detección más temprana del subtipo HSC-CHC en un sujeto y por lo tanto conduce a una mayor probabilidad de éxito en el tratamiento y supervivencia.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "biomarcadores" se usa indistintamente con "miARN" y se refiere a los marcadores asociados con CHC, que incluyen los al menos 39 biomarcadores de la Tabla 1. En el método de la invención, se pueden detectar algunos (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 o 35) o los 39 biomarcadores. Preferentemente, se detectan al menos 2 o más, más preferentemente al menos 5 o más biomarcadores. En realizaciones donde se detecta el biomarcador mir-181, el biomarcador puede ser uno o más de mir-181a1, mir-181a2, mir-181b1, mir-181b2 y mir-181c, preferentemente. A este respecto, se detectan algunos (es decir, 1, 2, 3 o 4) o los 5 biomarcadores mir-181.

35 Las técnicas adecuadas para determinar la presencia y el nivel de expresión de los biomarcadores en las muestras se encuentran dentro de la experiencia de la técnica. De acuerdo con uno de dichos métodos, el ARN celular total se puede purificar a partir de las células por homogenización en presencia de un tampón de extracción de ácidos nucleicos, seguida de la centrifugación. Los ácidos nucleicos se precipitan, y el ADN se elimina por tratamiento con DNasa y precipitación. Las moléculas de ARN se separan después por electroforesis en gel en geles de agarosa de acuerdo con las técnicas convencionales, y se transfieren a filtros de nitrocelulosa, por ejemplo, por la técnica denominada transferencia de "Northern". Después se inmoviliza el ARN en los filtros mediante calentamiento. La detección y cuantificación del ARN específico se lleva a cabo usando sondas apropiadamente marcadas de ADN o  
40 ARN complementarias al ARN en cuestión. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook *et al.*, eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 7.

45 Los métodos para la preparación de las sondas de ADN y ARN marcadas, y las condiciones de hibridación de las mismas con las secuencias de nucleótidos diana, se describen en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook *et al.*, eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulos 10 y 11. Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico se puede marcar con, por ejemplo, un radionúclido tal como <sup>3</sup>H, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>14</sup>C o <sup>35</sup>S; un metal pesado; o un ligando capaz de funcionar como un miembro de un par de unión específico para un ligando marcado (por ejemplo, biotina, avidina o un anticuerpo), una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, una enzima o similares.

50 La sondas se pueden marcar para una actividad específica alta bien por el método de traslación de muesca de Rigby *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 113:237-251(1977) o bien por el método de cebado aleatorio de Fienberg, *Anal. Biochem.*, 132:6-13 (1983). El último puede ser un método para sintetizar sondas marcadas con <sup>32</sup>P de actividad específica alta a partir de moldes de ARN. Por ejemplo, reemplazando nucleótidos ya existentes con nucleótidos altamente radiactivos de acuerdo con el método de traslación de muesca, es posible preparar sondas de ácidos nucleicos marcadas con <sup>32</sup>P con una actividad específica muy por encima de 10<sup>8</sup> cpm/microgramo. La detección autorradiográfica de la hibridación se puede realizar después exponiendo los filtros hibridados a una película  
55 fotográfica. El escaneo densitométrico de las películas fotográficas expuestas a los filtros hibridados proporciona una medida exacta de los niveles de biomarcador. Usando otro enfoque, los niveles de biomarcador se pueden cuantificar por sistemas de imagen computarizada, tales como el captador de fosfo-imagen de dinámica molecular 400-B 2D (Amersham Biosciences, Piscataway. N.Y).

65 Cuando el marcaje con radionúclido de sondas ADN o ARN no es práctico, se puede usar el método de cebado aleatorio para incorporar un análogo, por ejemplo, el análogo de dTTP 5-(N-(N-biotinil-épsilon-aminocaproil)-3-aminoalil)desoxi-uridina trifosfato, en la molécula de la sonda. La sonda oligonucleotídica biotinilada se puede detectar por reacción con proteínas de unión a biotina, tales como avidina, estreptavidina y anticuerpos (por ejemplo,

anticuerpos anti-biotina) acoplados a colorantes fluorescentes o enzimas que producen reacciones de color.

Además del Northern y otras técnicas de hibridación de transferencias de ARN, la determinación de los niveles de expresión de ARN se puede llevar a cabo usando la técnica de hibridación *in situ*. Esta técnica requiere menos células que la técnica de transferencia de Northern, e involucra la deposición de células completas en un cubreobjetos de microscopía y la exploración del contenido en ácidos nucleicos de la célula con una solución que contenga sondas de ácidos nucleicos radiactivos o marcados de otro modo (por ejemplo, ADNc o ARN). Esta técnica se adapta particularmente bien al análisis de muestras de biopsias de tejidos de sujetos. La práctica de la técnica de hibridación *in situ* se EE.UU. Nº 5.427.916.

El número relativo de ARN-pi en una muestra también puede determinarse por retrotranscripción, seguida de la amplificación de los transcritos de la retrotranscripción por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los niveles de transcritos de ARN se pueden cuantificar en comparación con un patrón interno, por ejemplo, el nivel de ARNm de un gen convencional presente en la misma muestra. Un gen adecuado para el uso como un patrón interno incluye, por ejemplo, miosina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los métodos para la RT-PCR cuantitativa y las variaciones de los mismos están dentro de la experiencia de la técnica.

En algunos casos, se desearía determinar simultáneamente el nivel de expresión de una variedad de genes biomarcadores distintos en una muestra. En ciertos casos, se desearía determinar el nivel de expresión de los transcritos de todos los genes biomarcadores conocidos correlacionados con CHC. La evaluación de los niveles de expresión específicos de cáncer para cientos de genes biomarcadores es lenta y requiere una gran cantidad de ARN total (al menos 20 mg para cada transferencia de Northern) y técnicas autorradiográficas que requieren isótopos radiactivos. Para superar estas limitaciones, se puede construir una biblioteca de oligos en formato de microplaca que contenga un conjunto de sondas oligonucleotídicas específicas para un conjunto de genes biomarcadores. Por ejemplo, la biblioteca de oligos puede contener sondas que corresponden a todos los biomarcadores conocidos del genoma humano. La biblioteca de oligos de microplaca puede expandirse para incluir miARN adicionales a medida que se descubran.

La microplaca se prepara a partir de sondas oligonucleotídicas específicas de genes generadas a partir de miARN conocidos. Por ejemplo, la matriz puede contener dos sondas oligonucleotídicas distintas para cada miARN, una que contiene la secuencia activa y otra que es específica para el precursor de miARN. La matriz también puede contener controles tales como una o más secuencias murinas que difieren de los ortólogos humanos en solamente unas pocas bases, que pueden servir como controles de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. También se pueden imprimir en la microplaca ARNt de ambas especies, proporcionando un control positivo interno, relativamente estable para hibridación específica. También se pueden incluir en la microplaca uno o más controles apropiados para hibridación no específica. Para este fin, las secuencias se seleccionan basándose en la ausencia de cualquier homología con cualquier miARN conocido.

La microplaca se puede fabricar por técnicas que se conocen en la materia. Por ejemplo, sondas oligonucleotídicas de una longitud apropiada, por ejemplo, 20 nucleótidos, se modifican en el amino 5' en la posición C6 y se imprimen usando sistemas de micromatriz adecuados disponibles, por ejemplo, La impresora de micromatrices GENEMACHINE OmniGrid 100 y los portaobjetos activados CODELINK de Amersham. El oligómero marcado de ADNc correspondiente a los ARN diana se prepara por retrotranscripción transcribiendo el ARN diana con cebador marcado. Después de la síntesis de la primera cadena, los híbridos ARN/ADN se desnaturalizan para degradar los moldes de ARN. Los ADNc diana marcados preparados de este modo se hibridan después con la microplaca de la micromatriz en condiciones de hibridación, por ejemplo, 6 veces de SSPE/formamida al 30 % a 25 grados C durante 18 horas, seguido de lavados en 0,75 veces de TNT a 37 grados C, durante 40 minutos. En las posiciones de la matriz en las que la sonda de ADN inmovilizada reconoce una diana complementaria de ADNc en la muestra, se produce la hibridación. El ADNc diana marcado marca la posición exacta de la micromatriz donde se produce la unión, permitiendo la detección y cuantificación automática. Los datos de salida consisten en una lista de acontecimientos de hibridación, que indican la abundancia relativa de secuencias específicas de ADNc, y por lo tanto la abundancia relativa del correspondiente biomarcador complementario, en la muestra del sujeto. En un ejemplo, el oligómero de ADNc marcado es un ADNc marcado con biotina, preparado a partir de un cebador marcado con biotina. Después se procesa la micromatriz por detección directa de los transcritos que contienen biotina usando, por ejemplo, el conjugado estreptavidina-Alexa647, y se escanea utilizando métodos de escaneo convencionales. Las intensidades de imagen de cada punto de la matriz son proporcionales a la abundancia del biomarcador correspondiente en la muestra del sujeto.

El uso de la matriz tiene una o más ventajas para la detección de la expresión de miARN. Primero, la expresión global de varios cientos de genes se puede identificar en una misma muestra en un punto temporal. Segundo, a través del diseño cuidadoso de las sondas oligonucleotídicas, se puede identificar la expresión tanto de las moléculas maduras como de las precursoras. Tercero, en comparación con los análisis de transferencia de Northern, la microplaca requiere una cantidad pequeña de ARN, y proporciona resultados reproducibles usando una cantidad tan pequeña como 2,5 mg de ARN total. El número relativamente limitado de miARN (unos pocos cientos por especie) permite la construcción de una micromatriz común para varias especies, con distintas sondas oligonucleotídicas para cada una. Dicha herramienta permitiría el análisis de la expresión trans-específica para cada

biomarcador conocido en distintas condiciones.

El sujeto puede ser un ser humano o animal que presente síntomas de CHC. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. El sujeto puede tener o no también el virus de la hepatitis B o cirrosis (tal como la inducida por alcohol, cirrosis biliar primaria, hemocromatosis genética, hepatitis autoinmune, colangitis esclerosante primaria). El CHC puede ser un tumor solitario, tumor multinodular y/o una lesión metastásica.

La muestra obtenida a partir del sujeto puede ser tejido hepático, que puede ser tejido tumoral o tejido normal. Como alternativa, la muestra puede ser del plasma o suero del sujeto, tejido de biopsias congelado, tejido de biopsias incluido en parafina, y combinaciones de los mismos.

La invención además proporciona un método para determinar el pronóstico de un sujeto determinando si el sujeto tiene el subtipo HSC-CHC, BDE-CHC, HP-CHC o MH-HCC. El método de pronóstico de la invención se puede utilizar en lugar de los métodos actuales de pronóstico. Como alternativa, el método de la invención se puede utilizar junto con métodos convencionales de pronóstico. Cuando se utiliza un enfoque combinado, los enfoques pronósticos tradicionales pueden incluir la tomografía computarizada (TC) espiral del hígado y tórax, imagen de resonancia magnética (IRM) con potenciación del contraste o angiografía con inyección de lipiodol, y biopsia, así como sistemas de estadificación actuales.

El método además proporciona un régimen de tratamiento que puede idearse para el sujeto basándose en el subtipo de CHC en el sujeto. A este respecto, el método de la invención permite un enfoque más personalizado para la medicina ya que se puede adaptar la agresividad del tratamiento al subtipo de CHC en el sujeto.

En una realización, la invención aprovecha la asociación entre los biomarcadores y los subtipos de CHC. Por consiguiente, la invención proporciona métodos de tratamiento que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un reactivo que comprende un ácido nucleico complementario de al menos uno de los biomarcadores asociados con HSC-CHC, BDE-CHC, HP-CHC o MH-CHC.

En otra realización, la invención toma ventaja de la asociación entre los biomarcadores mir-181 y las células madre de CHC a fin de determinar el subtipo de CHC en un sujeto y, opcionalmente, correlacionar el subtipo de CHC en el paciente con un pronóstico. Los biomarcadores mir-181 se asocian con el subtipo de CHC de tipo células madre hepáticas (HSC), que es positivo para EpCAM y AFP. EpCAM es una proteína transmembrana que contiene tres dominios extracelulares y un dominio citoplasmático. La función de EpCAM y el mecanismo de regulación de su expresión se desconocen bastante, pero se piensa que implica la adhesión célula-célula (Winter, Exp. Cell. Res., 285(1): 50-58 (2003)). EpCAM y AFP no se expresan en tejido hepático maduro. El subtipo HSC CHC típicamente tiene un mal pronóstico y supervivencia resultante (Lee, Hepatology, 40(3): 667-676 (2004); Lee, Nat. Med., 12(4): 410-416 (2006)). Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para determinar si el CHC detectado es del subtipo HSC-CHC. La determinación del subtipo de CHC es particularmente útil en la determinación del tratamiento apropiado para el sujeto, particularmente porque el CHC EPCAM+ AFP+ se asocia con la señalización de Wnt- $\beta$ -catenina. La señalización de Wnt- $\beta$ -catenina es crítica para el mantenimiento de la función de las células madre y la activación anómala se ha asociado a numerosos cánceres humanos, incluyendo el CHC. Los mir-181 pueden contribuir a la activación de la señalización de Wnt- $\beta$ -catenina, posiblemente a través de Dickkopf-1 (es decir, DKK1) y quinasa de tipo nemo (es decir, NLK), que son inhibidores de la ruta de Wnt- $\beta$ -catenina. La divulgación aprovecha la relación entre la regulación de mir-181 y las células madre de CHC, y proporciona métodos de pronóstico, y tratamiento basados en los mismos.

Las opciones de tratamiento pueden incluir tratamientos tradicionales así como enfoques de terapia génica que se dirijan específicamente a los miARN descritos en el presente documento. El tratamiento tradicional del CHC incluye, por ejemplo, inyección percutánea de etanol (IPE), ablación por radiofrecuencia, quimioembolización, y quimioterapia. El tratamiento se determina basándose en el estado del sujeto y las directrices se conocen en la técnica. (Véase por ejemplo, Ryder, Gut, 52: 1-8 (2003)).

La divulgación además proporciona composiciones farmacéuticas para el uso en los métodos del tratamiento de la invención. En este aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un reactivo que comprende un ácido nucleico o ácidos nucleicos complementarios de al menos uno, preferentemente al menos dos de los biomarcadores seleccionados de los que se identifican por las SEC ID N°: 1-39 y un transportador farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, el reactivo puede comprender ácidos nucleicos complementarios de al menos 5 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 25 o más, 30 o más, o 35 o más de los biomarcadores. El reactivo puede comprender solamente los ácidos nucleicos o los ácidos nucleicos en combinación con reactivos de suministro tales como plásmidos recombinantes, vectores virales, liposomas, etc. Preferentemente, para el tratamiento de HSC-CHC, la composición comprende ácidos nucleicos complementarios de los biomarcadores identificados por las SEC ID N°: 1-19, incluso más preferentemente, la composición comprende ácidos nucleicos complementarios de mir-181a1, mir-181a2, mir-181b1, mir-181b2 y mir-181c, y un transportador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, para el tratamiento de BDE-CHC, la composición comprende ácidos nucleicos complementarios de al menos uno, preferentemente al menos dos biomarcadores identificados por las SEC ID N°: 2, 9-17, y 19-35, y un transportador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, para el tratamiento

- de HP-CHC, la composición comprende ácidos nucleicos complementarios de al menos uno, preferentemente al menos dos biomarcadores identificados por las SEC ID N<sup>o</sup>: 1-8, 11-13, 17-18, 23, 28, 29 y 33-39, y un transportador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, para el tratamiento de MH-CHC, la composición comprende ácidos nucleicos complementarios de al menos uno, preferentemente al menos dos biomarcadores identificados por las
- 5 SEC ID N<sup>o</sup>: 1, 8-12, 14-17 y 19-39, y un transportador farmacéuticamente aceptable. La composición puede unirse y/o hacer que los biomarcadores sean ineficaces (es decir, inhibirlos), o como alternativa, alterar la expresión del gen codificante de los biomarcadores, alterando de ese modo las cantidades o niveles de biomarcadores producidos, la tecnología para los cuales se conoce bien en la técnica.
- 10 En la práctica de los presentes métodos de tratamiento, también se puede administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos una composición que inhiba al menos uno de los biomarcadores. Como se usa en el presente documento, "inhibir" significa que los niveles de biomarcador y/o producción del producto del gen biomarcador del gen correspondiente en la célula cancerosa después del tratamiento es menor que la cantidad producida antes del
- 15 tratamiento. En otra realización, se puede administrar una composición que aumenta la expresión de uno o más de los biomarcadores. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si los niveles de biomarcador o expresión génica se inhiben o aumentan en una célula cancerosa, usando por ejemplo las técnicas para determinar el nivel de los transcritos de los biomarcadores que han analizado anteriormente.
- 20 Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de una composición que inhibe la expresión de los biomarcadores o del gen biomarcador es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto que padece CHC. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de una composición inhibitoria para administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores tales como la talla y el peso del sujeto; el grado de penetración de la enfermedad, la edad, salud y sexo del sujeto; la vía de administración; y si la administración es regional o sistémica.
- 25 Por ejemplo, una cantidad eficaz de la composición que altera la expresión se puede basar en el peso aproximado de una masa tumoral para tratar. Se puede determinar el peso aproximado de una masa tumoral calculando el volumen aproximado de la masa, en el que un centímetro cúbico de volumen es aproximadamente equivalente a un gramo. Por lo tanto, en una realización, se puede utilizar una cantidad eficaz basada en el peso de una masa
- 30 tumoral. Como alternativa, una cantidad eficaz de la composición se puede basar en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto para tratar. Preferentemente, dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o entérica.
- 35 Un experto en la materia también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para administrar una composición que altera los niveles de biomarcador o expresión génica a un sujeto dado. Por ejemplo, se puede administrar la composición al sujeto una vez (por ejemplo, como una única inyección o deposición). Como alternativa, se puede administrar la composición una o dos veces al día a un sujeto durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, más preferentemente de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. Como alternativa, se puede administrar la composición una vez al día durante
- 40 siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz de la composición administrada al sujeto puede comprender la cantidad total de la composición administrada a lo largo del régimen de dosificación completo.
- 45 Las composiciones adecuadas para inhibir la expresión de gen biomarcador incluyen ARN bicatenario (tal como ARN de interferencia corto o pequeño o "ARNip"), ácidos nucleicos antisentido y moléculas de ARN enzimáticas tales como ribozimas. Cada una de estas composiciones se puede dirigir a un producto génico de un biomarcador dado y destruir o inducir la destrucción del producto génico del biomarcador.
- 50 Por ejemplo, la expresión de un gen marcador dado se puede inhibir induciendo el ARN de interferencia del gen biomarcador con una molécula de ARN bicatenario ("ARNbc") que tiene al menos el 90 %, por ejemplo el 95 %, 98 %, 99 % o 100 %, de homología de secuencia con al menos una parte del producto del gen biomarcador. En una realización preferente, la molécula de ARNbc es un "ARN de interferencia corto o pequeño" o "ARNip".
- 55 Los ARNip útiles en los métodos de la presente invención comprenden ARN bicatenario corto de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El ARNip comprende una cadena sentido de ARN y una cadena de ARN complementaria antisentido hibridadas conjuntamente por medio de interacciones de pares de bases de Watson y Crick convencionales (en lo sucesivo en el presente documento "formación de pares de bases"). La cadena sentido comprende una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a una secuencia de
- 60 ácido nucleico contenida en el producto del gen biomarcador diana.
- 65 Como se usa en el presente documento, el ARNip es "sustancialmente idéntico" a una secuencia diana contenida en la secuencia de ácido nucleico diana, es una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia diana, o que difiere de la secuencia diana en uno o dos nucleótidos. Las cadenas sentido y antisentido del ARNip pueden comprender dos moléculas de ARN monocatenarias complementarias, o pueden comprender una única molécula en la que dos partes complementarias forman pares de bases y que se unen covalentemente por un área de "horquilla"

monocatenaria.

El ARNip también puede ser un ARN alterado que difiere del ARN de origen natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como en el/los extremo(s) del ARNip o en uno o más nucleótidos internos del ARNip, o modificaciones que hagan el ARNip resistente a la digestión por nucleasas, o la sustitución de uno o más nucleótidos del ARNip con desoxirribonucleótidos.

Una o ambas cadenas del ARNip también pueden comprender un saliente 3'. Como se usa en el presente documento, un "saliente 3'" se refiere al menos a un nucleótido desapareado que se extiende desde el extremo 3' de un ARN bicatenario. Por lo tanto, en una realización, el ARNip comprende al menos un saliente 3' de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) de longitud, preferentemente de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, más preferentemente de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, y particularmente preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En una realización preferente, el saliente 3' está presente en ambas cadenas de ARNip, y tiene 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena del ARNip puede comprender salientes 3' de ácido ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

El ARNip se puede producir química o biológicamente, o se puede expresar a partir de un plásmido recombinante o vector viral para los productos del gen biomarcador aislados. Se describen métodos ejemplares para producir y ensayar moléculas de ARNbc o miARN en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N° 2002/0173478 y la patente de los EE.UU. N° 7.148.342.

La expresión de un gen biomarcador dado también se puede inhibir por medio de un ácido nucleico antisentido. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une al ARN diana por medio de interacciones ARN-ARN o ARN-ADN o ARN-ácido nucleico peptídico, que altera la actividad del ARN diana. Los ácidos nucleicos antisentido adecuados para el uso en los métodos de la presente invención son ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ARN, ADN, quimeras ARN-ADN, ANP) que generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico complementaria de una secuencia contigua de ácido nucleico en un producto del gen biomarcador. Preferentemente, el ácido nucleico antisentido comprende una secuencia de ácido nucleico que es 50-100 % complementaria, más preferentemente 75-100 % complementaria, y más preferentemente 95-100 % complementaria de una secuencia contigua de ácido nucleico en un producto del gen biomarcador.

Los ácidos nucleicos antisentido también pueden contener modificaciones de la cadena principal del ácido nucleico o de los restos de azúcar y base (o sus equivalentes) para potenciar la especificidad de diana, resistencia a nucleasas, suministro u otras propiedades relacionadas con la eficacia de la molécula. Dichas modificaciones incluyen restos de colesterol, intercalantes dobles tales como acridina o la inclusión de uno o más grupos resistentes a las nucleasas.

Los ácidos nucleicos antisentido se pueden producir química o biológicamente, o pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos de los genes biomarcadores aislados. Los métodos ejemplares para producirlos y ensayarlos están dentro de la experiencia de la técnica; véase, por ejemplo, Stein, *Science*, 261:1004 (1993) y patente de los EE.UU. N° 5.849.902 de Woolf *et al.*

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

Los ácidos nucleicos enzimáticos se pueden producir química o biológicamente, o pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos de los genes biomarcadores aislados. Se describen métodos ejemplares para producir y ensayar moléculas ARNbc o ARNpi en Werner, *Nucl. Acids Res.*, 23:2092-96 (1995); Hammann, *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.*, 9:25-31 (1999); y patente de los EE.UU. N° 4.987.071.

La administración de al menos una composición para inhibir al menos un biomarcador o expresión de un gen biomarcador inhibirá la proliferación de las células de cáncer en un sujeto que tiene CHC. Como se usa en el presente documento, "inhibir la proliferación de una célula cancerosa" significa matar la célula, o detener o ralentizar permanentemente o temporalmente el crecimiento de la célula. La inhibición de la proliferación de células cancerosas puede inferirse si el número de dichas células en el sujeto permanece constante o disminuye después de la administración de la composición de la invención. También se puede inferir una inhibición de la proliferación de



células cancerosas si el número absoluto de dichas células aumenta, pero la tasa de crecimiento tumoral disminuye.

El número de células cancerosas en el cuerpo de un sujeto se puede determinar por medición directa, o por estimación del tamaño de las masas tumorales primarias o metastásica. 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 células cancerosas.

El tamaño de una masa tumoral puede averiguarse por observación visual directa, o por métodos diagnósticos directos de imagen, tales como rayos X, imagen de resonancia magnética, ultrasonido y gammagrafía. Los métodos de imagen que se usan para averiguar el tamaño de la masa tumoral se pueden emplear con o sin agentes de contraste, como se conoce en la técnica. El tamaño de una masa tumoral también puede averiguarse por medios físicos, tales como la palpación de la masa de tejido o medición de la masa de tejido con un instrumento de medida, tal como un calibrador.

Las composiciones de la invención se pueden administrar a un sujeto por cualquier método adecuado para suministrar estas composiciones a las células cancerosas del sujeto. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar por métodos adecuados para transfectar células del sujeto con estas composiciones. Preferentemente, las células se transfectan con un plásmido o vector viral que comprende secuencias que codifican al menos un producto del gen biomarcador o composición inhibidora de la expresión del gen biomarcador.

Se conocen bien en la técnica métodos de transfección para células eucarióticas, e incluyen, por ejemplo, inyección directa del ácido nucleico en el núcleo o pronúcleo de una célula; electroporación; transferencia por liposomas o transferencia mediada por materiales lipofílicos; distribución de ácido nucleico mediada por receptor, biobalística o aceleración de partículas; precipitación con fosfato de calcio, y transfección mediada por vectores virales.

Por ejemplo, las células pueden transfectarse con una composición de transferencia liposómica, por ejemplo, DOTAP (metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, Boehringer-Mannheim) o un equivalente, tal como LIPOFECTIN. La cantidad de ácido nucleico usada no es crítica para la práctica de la invención; se pueden alcanzar resultados aceptables con 0,1-100 microgramos de ácido nucleico/10<sup>5</sup> células. Por ejemplo, se puede usar una relación de aproximadamente 0,5 microgramos de vector plasmídico en 3 microgramos de DOTAP por cada 10<sup>5</sup> células.

La composición también se puede administrar a un sujeto por cualquier vía de administración entérica o parenteral adecuada. Las vías de administración entérica adecuadas para los presentes métodos incluyen, por ejemplo, suministro oral, rectal o intranasal. Las vías de administración parenteral adecuadas incluyen, por ejemplo, administración intravascular (por ejemplo, inyección de embolada intravenosa, infusión intravenosa, inyección de embolada intraarterial, infusión intraarterial e instilación de catéter en la vasculatura); inyección peri e intra tisular (por ejemplo, inyección peritumoral e intratumoral, inyección retiniana o inyección subretiniana); inyección o deposición subcutánea, incluyendo infusión subcutánea (tal como mediante bombas osmóticas); aplicación directa en el tejido de interés, por ejemplo por un catéter u otro dispositivo de colocación (por ejemplo, un gránulo retiniano o un supositorio o un implante que comprenda un material poroso, no poroso o gelatinoso); e inhalación. Las vías preferentes de administración son inyección, infusión e inyección directa en el tumor.

En los presentes métodos, se puede administrar la composición al sujeto bien como ARN desnudo, en combinación con un reactivo de suministro, o como un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido recombinante o vector viral) que comprende las secuencias que expresan el producto del gen biomarcador o composición inhibidora de la expresión. Los agentes de distribución adecuados incluyen, por ejemplo, el agente lipófilo Mirus Transit TKO; lipofectina; lipofectamina; celfectina; policationes (por ejemplo, polilisina), y liposomas.

Los plásmidos recombinantes y vectores virales que comprenden secuencias que expresan el biomarcador o las composiciones inhibidoras de la expresión del gen biomarcador, y técnicas para distribuir dichos plásmidos y vectores a las células cancerosas, se han analizado anteriormente.

En una realización preferente, los liposomas se usan para distribuir un biomarcador o composición inhibidora de la expresión del biomarcador (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a un sujeto. Los liposomas también pueden incrementar la semivida en sangre de los productos génicos o ácidos nucleicos.

Los liposomas adecuados pueden formarse a partir de lípidos que forman vesículas convencionales, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros o con carga negativa y un esteroles, tal como colesterol. La selección de lípidos se guía generalmente considerando factores tales como el tamaño deseado del liposoma y la semivida de los liposomas en el torrente sanguíneo. Se conoce una diversidad de métodos para preparar liposomas, por ejemplo, como se describe en Szoka, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467 (1980); y patentes de los EE.UU. N<sup>o</sup> 4.235.871. 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Los liposomas para su uso en los presentes métodos pueden comprender una molécula ligando que dirija el liposoma a las células cancerosas. Se prefieren los ligandos que se unen a receptores prevalentes en células

cancerosas, tales como anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos de células tumorales.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir un transportador farmacéuticamente aceptable. La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa uno o más materiales de carga, diluyentes, otros excipientes o sustancias envasulantes sólidos o líquidos compatibles que son adecuados para la administración a un paciente humano o veterinario. El término "transportador" indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el principio activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de mezclarse con las moléculas de la presente invención, y entre ellos, de un modo que no altere sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada. Los materiales "farmacéuticamente aceptables" pueden administrarse a un paciente sin la producción de efectos fisiológicos no deseados tales como náuseas, mareos, erupciones o molestias gástricas. Por ejemplo, se desea que una composición terapéutica que comprende excipientes farmacéuticamente aceptables no sea inmunogénica cuando se administra a un paciente humano para fines terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes tamponadores adecuados, incluyendo: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos y timerosal.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con un transportador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniformemente e íntimamente la composición activa con un transportador líquido, un transportador sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, se le da forma al producto.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral convenientemente comprenden una preparación acuosa estéril de la composición de la invención, que es preferentemente isotónica con respecto a la sangre del receptor. Esta preparación acuosa se puede formular de acuerdo con métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión. La preparación inyectable también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier mezcla de aceite no volátil incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar ácidos grasos tales como el ácido oleico en la preparación de inyectables. Se pueden encontrar formulaciones transportadoras adecuadas para administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, FA.

Los sistemas de suministro de la presente divulgación están diseñados para incluir sistemas de suministro de liberación temporalizada, liberación retardada o liberación sostenida tales que la distribución de la composición de la invención ocurra antes, y con suficiente tiempo, para causar sensibilización del sitio para tratar. La composición de la invención se puede usar junto con otros agentes terapéuticos o terapias. Dichos sistemas pueden evitar las administraciones repetidas de la composición de la invención, aumentando la conveniencia para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para ciertas composiciones de la presente invención.

Numerosos tipos de sistemas de suministro están disponibles y se conocen por los expertos habituales en la materia. Estos incluyen sistemas basados en polímeros tales como poli(láctido-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Se describen microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos en, por ejemplo, Patente de los EE.UU. N° 5.075.109. Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-di-y triacilgliréridos; sistemas de liberación en hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos prensados que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación: (a) sistemas de erosión en los que la composición activa está contenida en una forma dentro de una matriz tales como los que se describen en las patentes de los EE.UU. N° 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de los EE.UU. N° 3.832.253 y 3.854.480. Además, se pueden usar sistemas de distribución en un soporte físico basado en una bomba, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

La divulgación además proporciona un método para evaluar la eficacia del tratamiento del CHC en un sujeto determinando si queda alguna célula madre de CHC en el hígado del sujeto que sigue un ciclo de tratamiento. A este respecto, se obtiene una muestra a partir del sujeto y se ensaya para detectar la presencia o ausencia de un biomarcador mir-181. Después se correlaciona la presencia o ausencia de un biomarcador mir-181 con la presencia o ausencia, respectivamente, de CHC EpCAM+ AFP+ en un sujeto. Esta información se usa para determinar si el

tratamiento del CHC en el sujeto ha sido eficaz o no.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no deberían interpretarse de ningún modo como limitaciones de su alcance.

5

## Ejemplos

Se usaron las siguientes técnicas para los ejemplos que se exponen a continuación.

10 *Muestras de ensayo clínicas.* Se obtuvieron tejidos hepáticos con consentimiento informado de sujetos que se sometieron a una resección radical entre 2002 y 2003 en el Instituto del Cáncer de Hígado y el Hospital Zhongshan (Fudan University, Shanghai, China). El estudio se aprobó por el Consejo de Revisión Institucional del Instituto del Cáncer de Hígado y el Instituto Nacional de Salud. Los criterios de inscripción de muestras incluyeron aquellos con un historial de infección por VHB o cirrosis relacionada con VHB, CHC diagnosticado por dos patólogos independientes, información detallada de la presentación clínica y las características patológicas, así como los datos del seguimiento detallados de al menos 3 años, que incluyeron reaparición intrahepática, metástasis venosa intrahepática, implicación de ganglios linfáticos, metástasis extrahepática, libres de la enfermedad, supervivencia total y causa de la muerte. La clasificación TNM actualizada es superior a otros sistemas de estadificación, incluyendo CLIP y OKUDA, para sujetos con CHC que se sometieron a una resección y por lo tanto se eligió para estratificar los sujetos en estadio temprano (estadio temprano TNM I y II) para el análisis de la capacidad de predicción de los miARN. Varotti, Eur J. Surg Oncol, 31(7):760-767 (2005); Huang *et al.*, J. Gastroenterol Hepatol, 20(5):765-771 (2005). Un estudio prospectivo reveló que el sistema BCLC es superior al nuevo sistema de clasificación TNM actualizado en 2002, por lo tanto, también se realizó el modelado de riesgos proporcionales de Cox basado en sujetos en estadios tempranos categorizados por BCLC (estadio 0 y A). Se realizaron perfiles de expresión génica en los CHC primarios y tejidos hepáticos no cancerosos correspondientes de 244 sujetos chinos con CHC. Entre ellos, el 93 % tenía cirrosis subyacente y el 68 % tenía un nivel sérico de alfa-fetoproteína (AFP) > 20 ng/ml. Se usó un total de 134 casos bien definidos como el grupo de capacitación. Entre ellos, 30 tenían lesiones primarias de CHC acompañadas por émbolos tumorales en las ramas principales de la vena porta (n=25), la vena cava inferior (n=2), o el conducto biliar común (n=4; uno también tenía trombos tumorales en la vena cava inferior) y 104 tenían un CHC solitario sin que se encontrara metástasis/reaparición en el seguimiento (3 años). En el análisis de validación, se usó un grupo de ensayo de 110 casos independientes cuyo pronóstico no pudo determinarse con exactitud en el momento de la resección por varios mecanismos de estadificación del CHC. Los casos de ensayo incluyeron 43 CHC multinodulares y 67 solitarios. De los 43 casos de CHC multinodular, 18 desarrollaron reaparición intrahepática y uno desarrolló metástasis extrahepática además de una recurrencia intrahepática. De los 67 casos de CHC solitario, 4 sujetos tenían un tumor solitario con una apariencia de nódulos agregados, 10 desarrollaron metástasis intra- y/o extrahepática, mientras que 49 desarrollaron reaparición intrahepática que se confirmó en el seguimiento (3 años). Además, se incluyeron como controles normales ocho tejidos hepáticos normales de sujetos sin la enfermedad (descrito en Budhu, Cancer Cell, 10(2):99-111 (2006)).

40 *Aislamiento del ARN y matrices de miARN* El aislamiento del ARN y la metodología de matrices de miARN se llevaron a cabo como se ha descrito en Ye, Nat Med, 9(4):416-423 (2003); Calin, N Engl J. Med, 353(17):1793-1802 (2005). En el análisis de los 244 casos de CHC, se aisló el ARN por pares a partir de tejido tumoral o no tumoral y las muestras se seleccionaron en orden aleatorio para el análisis de miARN para evitar el sesgo grupal. Se realizaron un total de 488 micromatrices. La plataforma de micromatrices (V 2.0) estaba compuesta de 250 miARN no redundantes humanos y 200 murinos. Para examinar la robustez de la plataforma de micromatrices de miARN, se analizó el miARN para determinar si la expresión podría diferenciar los 244 tejidos de sus tejidos hepáticos no cancerosos circundantes correspondientes. Usando un método de comparación de clase supervisado con un ensayo de t para muestras relacionadas univariante y un ensayo multivariante con 1000 permutaciones de la marca de clase con la tasa de falsos descubrimientos ajustada a  $\leq 1$  con el 99 % de confianza, se identificaron 209 miARN no redundantes que podrían diferenciar significativamente tejidos tumorales de CHC (T) de sus tejidos no tumorales (NT) correspondientes. Estos miARN significativos separaron claramente las muestras T y NT, ilustradas mediante análisis de agrupación jerárquica. El algoritmo de predicción de clase multivariante con el 10 % de validación cruzada y 100 permutaciones aleatorias indicó que estos miARN pueden proporcionar una predicción estadísticamente significativa de las muestras T y NT ( $p < 0,01$ ) con una precisión superior al 97 % mediante el predictor del valor más próximo. Estos análisis iniciales indicaron que las matrices de miARN eran robustas y podrían identificar una diferencia significativa entre el tumor y el tejido hepático no canceroso.

60 *Análisis estadístico.* Se realizó un análisis de agrupación jerárquica no supervisado por medio del programa informático GENESIS versión 1.5 desarrollado por Alexander Sturn (IBMT-TUG, Graz, Austria). Se usó el programa informático BRB ArrayTools V3.3 para el análisis supervisado como se ha descrito previamente (Ye, Nat Med, 9(4):416-423 (2003); Budhu, Cancer Cell, 10(2):99-111 (2006)). Se usó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para comparar la supervivencia de los sujetos basándose en los resultados de predicción, usando el programa basado en Excel WinSTAT. El valor p estadístico se generó por medio de la prueba de rango logarítmico de Cox-Mantel. La regresión de riesgos proporcionales de Cox se usó para analizar el efecto de dieciséis variables clínicas en la supervivencia o reaparición usando STATA 9.2 (College Station, TJ). La significación estadística se definió como  $p < 0,05$ . El análisis TargetScan se basó en una herramienta web desarrollada por Ben Lewis (Lewis, Cell,

65

120(1):15-20 (2005)). La regresión de riesgos proporcionales de Cox se usó para analizar el efecto de las variables clínicas en supervivencia de los sujetos total y sin recaídas, incluyendo edad, sexo, estado activo del VHB, AFP pre-resección, cirrosis, alanina transferasa (ALT), puntuación de Child-Pugh, tamaño tumoral, encapsulación tumoral, tipo nodular, estado de la invasión microvascular, grado Edmonson, y varios sistemas de estadificación pronóstico del CHC, incluyendo la estadificación BCLC (Linet, Semin Liver Dis, 19(3):329-338 (1999)); la clasificación CLIP ("The Cancer of the Liver Italian Program", Hepatology, 28(3):751-755 (1998)), la estadificación Okuda (Okuda, Cancer, 56(4):918-928 (1985)), y la clasificación TNF (American Joint Committee on Cancer (AJCC)/International Union Against Cancer (UICC)'s TNM Classification of Malignant Tumours, 6ª edición, Hoboken, NY, John Wiley & Sons 2002).

*qRT-PCR.* Se extrajo el ARN total usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La expresión de TACSTD1, BAMBI, DKK1, CCND1, CTNNB1 y MYC se midió por triplicado usando un sistema de detección de secuencias Applied Biosystems 7700 (Foster City, CA). Las sondas usadas fueron: TACSTD1, Hs00158980\_ml; CTNNB1, HS00170025\_ml; BAMBI, HS00180818, DKK1, Hs00183740\_ml, CCND1, Hs00277039\_ml, CTNNB1, MYC, Hs00153408\_ml; 18S, Hs999999901\_s1 (Applied Biosystems). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las sugerencias del fabricante.

*Análisis inmunohistoquímico.* El análisis inmunohistoquímico se realizó usando kits Envision+ (DAKO EE.UU., Carpintería, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos primarios se usaron del siguiente modo: anticuerpo monoclonal clon 14 anti- $\beta$ -catenina (BD Transduction Laboratories, San José, CA) y anticuerpo monoclonal clon VU-1d9 anti-EpCAM (Oncogene Research Products, San Diego, CA).

*Inmunofluorescencia.* Las células se cultivaron en portaobjetos con cámaras y se trataron con los productos químicos indicados durante 48 h. Después se fijaron las células con formaldehído al 4 % durante 10 min, metanol durante 20 min y se incubaron en solución salina tamponada con fosfato. Las muestras se bloquearon con suero normal de asno al 10 % durante una 1 h a temperatura ambiente y se tiñeron con los anticuerpos primarios durante 1 h a 37 °C, seguidos de anticuerpos Alexa 568 anti ratón conjugados con Texas Red (Molecular Probes, Eugene, OR).

*EMSA.* El Tcf-4 recombinante se expresó en *E. coli* como una proteína de fusión GST y se extrajo. El EMSA se realizó usando el kit de EMSA quimioluminiscente LightShift (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se construyeron los oligonucleótidos de ADN bicatenario que contenían los sitios potenciales de unión a Tcf del promotor de EpCAM y 10 nucleótidos adyacentes corriente arriba y corriente abajo y se usaron como sondas. También se usaron sondas mutantes TBE1 y TBE2.

*Líneas celulares, antisentido y plásmidos.* Se cultivaron rutinariamente líneas celulares conocidas Hep3B tipo B, MHCC97 tipo C, Smmc7721 tipo D, HUH1 y HUH7 de CHC. Las células se transfectaron con pMSCV-mir-181b-1 para los ensayos funcionales. También se trataron las células HUH7 con antisentido 2'-O-metil mir-181s, un inhibidor de mir-181.

### Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra que la expresión de miARN puede diferenciar el tejido de CHC del tejido no canceroso y puede distinguir entre cuatro subtipos de CHC.

Utilizando pares de muestras de tejido de CHC y no-CHC circundante de un total de 230 pacientes de CHC, se descubrió que un total de 209 miARN no redundantes proporcionaba el 97 % de precisión en la identificación correcta de las muestras (multivariante  $p < 0,01$ ). La heterogeneidad de las muestras era evidente y las muestras se agruparon basándose en los cuatro subtipos de CHC (HSC, BDE, HP y MH).

Se buscó la expresión de miARN significativos entre los cuatro subtipos de CHC. La agrupación jerárquica reveló que 39 genes de pre-miARN mostraron alteraciones significativas de la expresión en los cuatro subtipos de CHC ( $p < 0,002$ , FDR  $< 0,05$ ) de los genes solapantes basándose tanto en la comparación de clase como en la predicción de clase con una validación cruzada con multiplicidad de 10 para establecer la exactitud de predicción (Tabla 1). De los 39 miARN, algunos estaban regulados positivamente y otros estaban regulados negativamente en cada subtipo (Fig.10).

Tabla 1

CHC	Grupo	SEC ID N°	símbolo del gen	localización del gen	secuencia madura	Paramétrico valor-p	FDR	Permutación valor-p	Media geométrica de las intensidades										positiva /negativa					
									CHC					Higado Normal						No -CHC				
									BDE	HSC	HPC	MH		BDE	HSC	HPC	MH			BDE	HSC	HPC	MH	
HSC	1	let-7a-1	9q22.32	9q22.32	guaggua-guaguu-guauagu	0,0002	0,0089	0,0003	0,0003	720	491	442	592	720	4030	2910	2282	2409	positiva					
	2	let-7a-2	11q24.1	11q24.1	ugaggua-guaguu-guauagu	0,0003	0,0101	0,0003	0,0003	1592	1035	878	1136	1570	191	194	203	192	positiva					
	3	let-7a-3	22q13.31	22q13.31	ugaggua-guaguu-guauagu	0,0027	0,0362	0,0018	0,0018	1406	996	999	1185	1450	1246	1386	1474	1317	positiva					
	4	let-7b	22q13.31	22q13.31	ugaggua-guaguu-guaguu	0,0041	0,0455	0,0037	0,0037	2134	1675	1529	1826	2202	147	180	119	128	positiva					
	5	let-7c	21q21.1	21q21.1	ugaggua-guaguu-guauagu	0,0019	0,0281	0,0013	0,0013	1614	1226	1048	1353	2017	1048	1055	1159	980	positiva					
	6	let-7d	9q22.32	9q22.32	agaggua-guaguu-guaguu	0,0002	0,0087	0,0002	0,0002	893	632	556	670	976	1191	1071	1011	934	positiva					
	7	let-7f-2	Xp11.22	Xp11.22	cauagu-ugaggua-guaguu-guauagu	0,0028	0,0362	0,0026	0,0026	482	345	326	422	478	733	661	692	661	positiva					
	8	let-7g	3p21.2	3p21.2	ugaggua-guaguu-guacagu	0,0006	0,0138	0,0003	0,0003	1043	766	658	801	962	2050	1419	1441	1363	positiva					
	9	mir-129-1	7q32.1	7q32.1	cuuuu-ugcg-gucug-ggcuugcu	0,0004	0,0116	0,0003	0,0003	274	265	215	170	178	3002	3067	2779	2859	positiva					



CHC	Grupo	SEC ID N°	símbolo del gen	localización del gen	secuencia madura	Paramétrico		FDR	Permutación		Media geométrica de las intensidades						positiva /negativa	
						valor-p	valor-p		CHC			No -CHC			positiva /negativa			
									BDE	HSC	HPC	MH	Normal	BDE		HSC		HPC
		19	mir-92-2	Xq26.2	uaugcac- uugucccg- gccug	0,0003	0,0101	0,0002	10397	19133	14127	11409	18228	7590	13765	15979	15213	negativa
		20	mir-106a	Xq26.2	aaaagugcu uacagug- cagguagc	0,0002	0,0085	0,0001	1471	2316	1733	1318	1239	1848	1767	1727	1699	positiva
		21	mir-106b	7q22.1	uaaagugcu gacagug- cagau	0,0006	0,0135	0,0006	860	1078	860	712	520					positiva
		9	mir-129-1	7q32.1	cuuu- ugcg- gucug- ggcuugcu	0,0004	0,0116	0,0003	274	265	215	170	178	191	194	203	192	positiva
		16	mir-17	13q31.3	caaagugcu uacagug- cagguagu	0,0001	0,0079	0,0001	1608	2957	1994	1650	1376	1972	2305	2050	2171	positiva
		22	mir-181a-1	1q31.3	aacauu- caogcu- gucggg- gagu	0,0004	0,0108	0,0003	1081	1355	991	921	804	1024	1137	1132	1098	positiva
		23	mir-181a-2	9q33.3	aacauu- caogcu- gucggg- gagu	0,0000	0,0039	0,0000	639	858	588	526	499	719	767	815	768	positiva
		11	mir-181b-1	1e31.3	aacauuca- uugcu- gucggugg	0,0000	0,0001	0,0000	1182	1344	926	719	608	1048	1055	1159	980	positiva
		12	mir-181b-2	9q33.3	aacauuca- uugcu- gucggugg	0,0000	0,0007	0,0000	1298	1613	1153	988	864	1246	1386	1474	1317	positiva

CHC	Grupo	SEC ID N°	símbolo del gen	localización del gen	secuencia madura	Paramétrico valor-p	FDR	Permutación valor-p	Media geométrica de las intensidades												positiva /negativa
									CHC						No -CHC						
									BDE	HSC	HPC	MH	Higado Normal	BDE	HSC	HPC	MH	Higado Normal	BDE	HSC	
					aacauu- caaccu- gucgu- gagu uaagugcu uauagug- cagguag agcuacau- ugucugcug gguuu agcuacauc ug- gcuacug- ggucuc caugcac- uugucucg- gucuga uauug- cacauuac- uaaguugc gcacau- uacacg- gucgaccu- cu uccagcuc- cuauau- gaugccuuu uauugcac- uugucccg- gccug	0,0000 0,0000 0,0005 0,0002 0,0006 0,0000 0,0000 0,0000 0,0001 0,0001 0,0001 0,0014	0,0011 0,00123 0,0085 0,0135 0,0039 0,0007 0,0079 0,0084 0,0218	0,0000 0,0007 0,0000 0,0000 0,0000 0,0000 0,0000 0,0000 0,0000 0,0000 0,0000 0,0000	564 1201 1842 2023 1573 2713 1140 200 217 204 217 17617	886 1376 2103 3332 1920 3722 1536 213 204 213 25783	537 1042 1956 2103 1492 2714 1227 203 168 89 21298	515 718 678 891 640 3056 1296 83 215 21489	584 739 763 741 769 968 846 1060 128 22036	741 1160 1160 846 1060 128 22036	positiva positiva positiva positiva positiva positiva positiva positiva positiva positiva positiva positiva						



CHC	Grupo	SEC ID N°	símbolo del gen	localización del gen	secuencia madura	Paramétrico		FDR		Permutación		Media geométrica de las intensidades											
						valor-p	valor-p	CHC			No -CHC			Higado			positiva						
								BDE	HSC	HPC	MH	BDE	HSC	HPC	MH	BDE	HSC	HPC	MH	BDE	HSC	HPC	MH
		19	mir-92-2	Xq26.2	uuuugcac- uuugcccg- gccug	0,0003	0,0101	0,0002	10397	19133	14127	11409	18228	13590	16251	15375	14177	positiva					
		15	mir-93	7q22.1	aaagugcu- guucgug- cagguag	0,0025	0,0343	0,0023	1973	1950	1589	1273	901	2050	1419	1441	1363	positiva					
		2	let-7a-2	11q24.1	ugaggua- guagguu- guauaguu	0,0003	0,0101	0,0003	1592	1035	878	1136	1570	2303	2082	1983	1947	negativa					
		31	mir-122a	18q21.31	uggagugu- gacaaug- guguuugu	0,0032	0,0391	0,0049	687	529	651	848	1338	1730	1609	1491	1625	negativa					
		32	mir-125b-1	11q24.1	uccugga- gac- ccuaacuu- guga.	0,0007	0,0138	0,0003	1467	905	923	1510	3329	4016	3551	3319	3336	negativa					
		33	mir-125b-2	21q21.1	uccugga- gac- ccuaacuu- guga	0,0007	0,0145	0,0009	1696	1154	1202	1801	3245	3608	3620	3529	3471	negativa					
		10	mir-129-2	11p11.2	cuuuu- ugcg- gucug- ggcuugcu	0,0002	0,0085	0,0001	484	338	404	446	608	615	525	513	509	negativa					
		34	mir-29a	7q32.3	uagcac- caucu- gaaaugg- uu	0,0002	0,0085	0,0004	1477	1030	964	1630	1150	2289	2304	2036	2166	negativa					
		35	mir-29b-2	1q32.2	uagcacca- uuugaaau- caguguu	0,0004	0,0116	0,0009	1076	984	926	1510	1234	1690	2229	2032	2034	negativa					

CHC	Grupo	SEC ID Nº	símbolo del gen	localización del gen	secuencia madura	Paramétrico valor-p	FDR	Permutación valor-p	Media geométrica de las Intensidades									
									CHC					No -CHC				
									BDE	HSC	HPC	MH	Normal	Higado	BDE	HSC	HPC	MH
HP	28	mir-32	9q31.3	uaaug-cacauuac-uaaguugc-gacau-uacaog-gucgaccu-cu	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	1140	1536	1227	800	1296	1366	1242	1219	1060	positiva
	29	mir-323	14q32.31	cu	0,0001	0,0079	0,0001	0,0001	200	213	203	83						positiva
	18	mir-301	17q23.2	cagug-caauagua-uugu-aaagc	0,0044	0,0473	0,0040	0,0040	6047	11619	14523	13198	25310	7590	13765	15979	15213	positiva
	36	mir-324	17p13.1	cgcauc-ccuag-ggcauug-gugu	0,0038	0,0418	0,0035	0,0035	413	432	434	359	415	379	384	405	403	positiva
	37	mir-99b	19q13.41	caccgua-gaacgac-cuugog	0,0036	0,0410	0,0034	0,0034	239	248	257	200	165	200	179	202	190	positiva
	1	let-7a-1	9q22.32	ugaggua-guagguu-guaugu	0,0002	0,0089	0,0003	0,0003	720	491	442	592	720	1191	1071	1011	934	negativa
	2	let-7a-2	11q24.1	ugaggua-guagguu-guaugu	0,0003	0,0101	0,0003	0,0003	1592	1035	878	1136	1570	2303	2082	1983	1947	negativa
	3	let-7a-3	22q13.31	ugaggua-guagguu-guaugu	0,0027	0,0362	0,0018	0,0018	1406	996	999	1185	1450	2199	2007	2127	1989	negativa
	4	let-7b	22q13.31	ugaggua-guagguu-gugugguu	0,0041	0,0455	0,0037	0,0037	2134	1675	1529	1826	2202	3002	3067	2779	2859	negativa



CHC	Grupo	SEC ID N°	símbolo del gen	localización del gen	secuencia madura	Paramétrico valor-p	FDR	Permutación valor-p	Media geométrica de las intensidades										positiva /negativa
									CHC					No -CHC					
									BDE	HSC	HPC	MH	Higado Normal	BDE	HSC	HPC	MH		
		13	mir-196a-2	12q13.13	uagguagu- uucauguu- guugg uagcac- caucu-	0,0036	0,0410	0,0045	1585	1226	1533	1791	4030	2910	2282	2409	negativa		
		34	mir-29a	7q32.3	gaaucgg- uu uagcacca- uuugaaau- caguguu uagcacca- uuugaaau- caguguu uagcacca- uuu-	0,0002	0,0085	0,0004	2465 1477	1030	964	1630	2289	2304	2036	2166	negativa		
		38	mir-29b-1	7q32.3	uagcacca- uuugaaau- caguguu uagcacca- uuugaaau- caguguu uagcacca- uuu-	0,0008	0,0166	0,0022	1194	904	749	1308	1866	2062	1751	1813	negativa		
		35	mir-29b-2	1q32.2	uagcacca- uuugaaau- caguguu uagcacca- uuu-	0,0004	0,0116	0,0009	1076	984	926	1510	1690	2229	2032	2034	negativa		
		39	mir-29c	1q32.2	gaaucggu uagcacca- uuu-	0,0015	0,0232	0,0020	1047	917	820	1308	1619	2165	1895	1797	negativa		
MH		1	let-7a-1	9q22.32	uagguagu- guagguu- guuagu uagguagu- gacaaug- guguuugu uccuga- gac- ccuaacuu- guga uccuga- gac- ccuaacuu- guga	0,0002	0,0089	0,0003	720	491	442	592	615	525	513	509	positiva		
		31	mir-122a	18q21.31	uagguagu- gacaaug- guguuugu uccuga- gac- ccuaacuu- guga uccuga- gac- ccuaacuu- guga	0,0032	0,0391	0,0049	687	529	651	848	1191	1071	1011	934	positiva		
		32	mir-125b-1	11q24.1	uagguagu- gacaaug- guguuugu uccuga- gac- ccuaacuu- guga uccuga- gac- ccuaacuu- guga	0,0007	0,0138	0,0003	1467	905	923	1510	1730	1609	1491	1625	positiva		
		33	mir-125b-2	21q21.1	uagguagu- gacaaug- guguuugu uccuga- gac- ccuaacuu- guga uccuga- gac- ccuaacuu- guga	0,0007	0,0145	0,0009	1696	1154	1202	1801	4016	3551	3319	3336	positiva		

CHC	Grupo	SEC ID <sup>o</sup>	símbolo del gen	localización del gen	secuencia madura	Paramétrico valor-p	FDR	Permutación valor-p	Media geométrica de las intensidades									
									CHC					No -CHC				
									BDE	HSC	HPC	MH	Normal	Higado	BDE	HSC	HPC	MH
					cuuu- ugcg- gucug- ggcuugcu uagcac- caucu- gaaaucgg- uu uagcacca- uuuuaau- caguguu uagcacca- uuuuaau- caguguu uagcacca- uuu- gaaaucggu ugaggua- guaguuu- guacagu aaaagugcu uacagug- cagguagc uaaagugcu gacagug- cagau cuuu- ugcg- gucug- ggcuugcu	0,0002 0,0085 0,0002 0,0085 0,0008 0,0166 0,0004 0,0116 0,0015 0,0232	0,0001 0,0001 0,0004 0,0004 0,0022 0,0009 0,0020 0,0020	484 338 404 446 608 3608 3529 3471	1477 1030 964 1630 1150 2289 2304 2036	904 749 1308 918 1866 2062 1751 1813	1047 917 820 1308 1018 1619 2165 1895	1043 766 658 801 962 1434 1431 1332	1471 2316 1733 1318 1239 719 767 815	860 1078 860 712 520 1048 1055 1159	274 265 215 170 178 1246 1386 1474	1797 1294 768 980 1317	positiva positiva positiva positiva positiva positiva positiva positiva positiva positiva negativa negativa negativa negativa negativa	
10	mir-129-2	11p11.2				0,0002	0,0085	0,0001	484	338	404	446	608	3608	3529	3471	positiva	
34	mir-29a	7q32.3				0,0002	0,0085	0,0004	1477	1030	964	1630	1150	2289	2304	2036	2166	positiva
38	mir-29b-1	7q32.3				0,0008	0,0166	0,0022	1194	904	749	1308	918	1866	2062	1751	1813	positiva
35	mir-29b-2	1q32.2				0,0004	0,0116	0,0009	1076	984	926	1510	1234	1690	2229	2032	2034	positiva
39	mir-29c	1q32.2				0,0015	0,0232	0,0020	1047	917	820	1308	1018	1619	2165	1895	1797	positiva
9	let-7g mir-	3p21.2				0,0006	0,0138	0,0003	1043	766	658	801	962	1434	1431	1332	1294	negativa
20	106a	Xq26.2				0,0002	0,0085	0,0001	1471	2316	1733	1318	1239	719	767	815	768	negativa
21	mir-106b	7q22.1				0,0006	0,0135	0,0006	860	1078	860	712	520	1048	1055	1159	980	negativa
9	mir-129-1	7q32.1				0,0004	0,0116	0,0003	274	265	215	170	178	1246	1386	1474	1317	negativa





**Ejemplo 2**

Este ejemplo demuestra que los mir-181s están asociados con HSC-CHC y contribuyen a la función de las células madre de cáncer de hígado.

5 Los niveles de expresión de los mir-181 tanto en los miARN precursores (A) como en los maduros (B) aumentaron significativamente en HSC-CHC y BDE-CHC pero disminuyeron en los CHC HP y MH, frente a sus tejidos no CHC correspondientes. HSC-CHC y BDE-CHC se refieren a CHC con características de tipo células madre y características de tipo epitelio de conducto biliar, respectivamente. La expresión de mir-181, basándose en el  
10 análisis de micromatrices de precursores de miARN en cada subtipo de CHC frente a los tejidos no CHC correspondientes de 230 pacientes se muestra en la Figura 1 A-E para mir-181a1, mir-181a2, mir-181b1, mir-181b2 y mir-181c, respectivamente. Las relaciones de expresión génica se muestran (media  $\pm$  95 % IC) en escala log2. Las figuras 1F-J muestran el análisis de RT-PCR de todos los mir-181 maduros en 40 pares de muestras de CHC y no CHC. El análisis de la gráfica de dispersión de los pre-mir-181 y de los mir-181 maduros se muestra en la Figura 2, representando los valores de  $r$  el coeficiente de correlación de Spearman.

A continuación, se correlacionó positivamente la expresión de mir-181 con la activación de la señalización de Wnt- $\beta$ -catenina y se correlacionó negativamente con la expresión de numerosos genes de hepatocitos maduros tanto en muestras de ensayo clínicas como en líneas celulares de CHC cultivadas. Se realizó análisis de agrupación jerárquica de 5 pre-mir-181, 15 genes específicos de hepatocitos y 5 genes asociados con beta-catenina cuyas expresiones se correlacionaban significativamente entre sí ( $p < 0,001$ ) a partir del análisis de correlación entre los datos de las micromatrices y datos de una matriz de ARNm. En 3 tipos distintos de líneas celulares de CHC, la expresión de mir-181 se correlacionaba positivamente con el nivel de proteína beta-catenina (Fig.9).

25 Después de cultivar las células HuH1 con medio de cultivo ESC, que es un medio basal optimizado para el crecimiento de células madre embrionarias indiferenciadas (ES), la expresión de los genes regulados por mir-181 y beta-catenina aumentó y la expresión de los genes específicos del hepatocito disminuyó tal como se analizó por RT-PCR (Figs. 3A-C) así como por inmunotransferencia usando anticuerpos para beta-catenina y actina (como un control). Después de la retirada de los medios ESC, la expresión de los genes anteriores se revirtió, tal como se analizó por qRT-PCR (Figs. 3D-F). La expresión génica se midió por triplicado y se muestra como la media  $\pm$  DT.

**Ejemplo 3**

35 Este ejemplo demuestra que la expresión de mir-181 está involucrada en la activación de la señalización de wnt-beta-catenina.

Después de transfectar las células HuH1 con pMSCV-mir-181b-1, se detectó mir-181-b por RT-PCR y la expresión se comparó con la de las células pMSCV-hTR. La expresión génica se midió por triplicado y se muestra como la media  $\pm$  DT en la Fig. 4. Como se muestra, mir-181 se sobreexpresó en las células HuH1.

40 Se trataron las células HuH7 con antisentido 2'-O-metil mir-181s y posteriormente se detectó la expresión de todos los mir-181. Una disminución significativa en la expresión génica (en comparación con el oligo control), que se midió por triplicado, se muestra como media  $\pm$  DT en la Fig.5.

45 Después de la sobreexpresión de mir-181 en las células HuH1, se detectó la expresión de los genes regulados por beta-catenina (CCND1, TACSTD1 y DKK1) por RT-PCR y se comparó con la expresión de las células pMSCV-hTR (Figs. 6A-C). Los lisados celulares de las líneas celulares también se analizaron por inmunotransferencias con anticuerpos para  $\beta$ -catenina y actina.

50 Después de la regulación negativa de mir-181 en las células HuH7, se detectó la expresión de los genes regulados por beta-catenina (CCND1, TACSTD1 y DKK1) por RT-PCR y se comparó con la expresión de las células pMSCV-hTR (Figs. 6D-F). Los lisados celulares de las líneas celulares también se analizaron por inmunotransferencias con anticuerpos para  $\beta$ -catenina y actina.

55 Los mir-181 afectaron a la expresión de wnt-beta-catenina. Es posible que esto ocurra a través de una conexión funcional de retroalimentación. DKK1 es un inhibidor de beta-catenina. Beta-catenina induce a los mir-181 así como DKK1, lo que posteriormente inhibe la beta-catenina. Se cree que mir-181 actúa inhibiendo la actividad inhibidora de DKK1. Los sitios de unión de los mir-181 predichos en el 3'-UTR de DKK1 se muestran en la Fig. 7A-B. Se usó el ADNc homólogo 1 de dickkopf de *Homo sapiens* BC001539. La Figura 7A muestra los sitios de unión en la posición 611-632 del 3'-UTR de DKK1. La Figura 7B muestra los sitios de unión predichos en la posición 771-799 del 3'-UTR de DKK1.

65 Los sitios de unión predichos del factor de transcripción 4 (TCF-4) ((A/T)(A/T)CAAAG) o (CTTTG(A/T)(A/T)) en los promotores de los mir-181 se muestran en las Figs. 8A-D. Se analizaron 6.060 pares de bases, aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. La Figura 8A muestra el promotor de mir-181a1 y mir-181b1 en el cromosoma 1, para los cuales se usó el cóntigo genómico NW\_926128, del cromosoma 1 de *Homo sapiens*. La Figura 8B muestra el



5 promotor de mir-181 a2 y mir-181b2 en el cromosoma 9, para los cuales se usó el cóntigo genómico NT\_008470 del cromosoma 9 de *Homo sapiens*. En la base de datos Sanger, ambos genes EST se han predicho en la región de localización de mir-181c y mir-181d, que tienen distintos sitios de inicio de la transcripción (Figs. 8C-D). El promotor de mir-181c y mir-181d en el cromosoma 19 en la Fig. 8C es el promotor de ENSESTT00000290819. El promotor de mir-181c y mir-181d en el cromosoma 19 en la Fig. 8D es el promotor de ENSESTT00000290818.

10 Se interpretará que el uso de los términos "un" y "una" y "el" y "la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que contradiga claramente el contexto. Los términos "comprender", "tener", "incluir" y "contener" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, significa que "incluyen, pero no se limitan a,") a menos que se indique otra cosa. La repetición de intervalos de valores del presente documento tiene simplemente la intención de servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o que se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") que se proporciona en el presente documento, pretende simplemente clarificar mejor la invención y no supone una limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje de la memoria descriptiva debería interpretarse como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> WANG, Xin Wei JI, Junfang

<120> MÉTODOS PARA DETERMINAR EL SUBTIPO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR Y DETECTAR CÉLULAS MADRE DE CÁNCER HEPÁTICO

30 <130> 701608

<160> 39

35 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 1  
 ugagguagua gguuguauag u 21

45 <210> 2  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 2  
 ugagguagua gguuguauag uu 22

55 <210> 3  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3  
 ugagguagua gguuguaugg uu 22

60 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

65 <400> 4  
 ugagguagua gguugugugg uu 22

	<210> 5 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 5 ugagguagua gguuguaugg uu	22
	<210> 6 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10		
	<400> 6 agagguagua gguugcauag u	21
15		
	<210> 7 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20		
	<400> 7 ugagguagua gauuguauag u	21
25		
	<210> 8 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30		
	<400> 8 ugagguagua guuuguacag u	21
35		
	<210> 9 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40		
	<400> 9 cuuuuugcgg ucugggcuug cu	22
45		
	<210> 10 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50		
	<400> 10 cuuuuugcgg ucugggcuug cu	22
55		
	<210> 11 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60		
	<400> 11 aacaucauu gcugucggug gg	22
65		
	<210> 12 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 12 aacaucauu gcugucggug gg	22

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 13  
 uagguaguuu cauguuguug g 21  
 <210> 14  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 10  
 <400> 14  
 uccagcuccu auaugaugcc uuu 23  
 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 20  
 <400> 15  
 aaagugcugu ucgugcaggu ag 22  
 <210> 16  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 16  
 caaagugcuu acagugcagg uagu 24  
 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
 <400> 17  
 aacauucaac cugucgguga gu 22  
 <210> 18  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 18  
 cagugcaaua guauugucaa age 23  
 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50  
 <400> 19  
 uauugcacuu gucccggccu g 21  
 <210> 20  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 60  
 <400> 20  
 aaaagugcuu acagugcagg uagc 24  
 <210> 21  
 <211> 21

<212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 21  
 5 uaaagugcug acagugcaga u 21  
  
 <210> 22  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 10 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 22  
 aacauucaac gcugucggug agu 23  
  
 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 23  
 20 aacauucaac gcugucggug agu 23  
  
 <210> 24  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 24  
 25 uaaagugcuu auagucagg uag 23  
  
 <210> 25  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 25  
 35 agcuacauug ucugcuggu uu 22  
  
 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 26  
 45 agcuacaucu ggcuacuggg ucuc 24  
  
 <210> 27  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 27  
 50 cauugcacuu gucucggucu ga 22  
  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 28  
 60 uauugcacau uacuaaguug c 21  
  
 <210> 29  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29  
 gcacauuaca cggucgaccu cu 22

5 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 30  
 uauugcacuu gucccggccu g 21

15 <210> 31  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 31  
 uggaguguga caaugguguu ugu 23

25 <210> 32  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 32  
 ucccugagac ccuaacuugu ga 22

35 <210> 33  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 33  
 ucccugagac ccuaacuugu ga 22

45 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 34  
 uagcaccauc ugaaucggu u 21

55 <210> 35  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

60 <400> 35  
 uagcaccauu ugaaucagu guu 23

65 <210> 36  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36  
 cgcauccccu agggcauugg ugu 23

<210> 37  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37  
 cacccguaga accgaccuug cg 22

# ES 2 537 349 T3

<210> 38  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 38  
uagcaccauu ugaaucagu guu 23

10

<210> 39  
<211> 20  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 39  
uagcaccauu ugaaucggu 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar el subtipo del carcinoma hepatocelular de tipo epitelio de conducto biliar (BDE-CHC) de un carcinoma hepatocelular (CHC) en un sujeto que comprende:
- 5
- a) obtener una muestra de tejido hepático obtenida del sujeto que tiene CHC,
  - b) llevar a cabo un análisis de laboratorio en la muestra de tejido para determinar la expresión de miR-222 [SEC ID N°:26],
  - c) correlacionar la expresión de miR-222 [SEC ID N°:26] en la muestra de tejido con el subtipo de carcinoma hepatocelular de tipo epitelio de conducto biliar (BDE-CHC) de CHC en el sujeto, y
  - d) determinar el subtipo del CHC a partir de la correlación, en la que la sobreexpresión de miR-222 en la muestra de tejido, en comparación con la expresión de miR-222 en tejido no tumoral del sujeto, es indicativa de carcinoma de tipo epitelio de conductos biliares (BDE-CHC).
- 10
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende: seleccionar la muestra de tejido del grupo que consiste en tejido tumoral de hígado, tejido de biopsia congelado, tejido de biopsia incluido en parafina, suero, plasma y combinaciones de los mismos.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que además comprende: analizar la muestra de tejido para la presencia o ausencia del miR-222 mediante una o más de las técnicas seleccionadas del grupo que consiste en técnicas de micromatriz, amplificación por PCR, hibridación *in situ*, electroforesis en gel y combinaciones de las mismas.

FIG. 1A

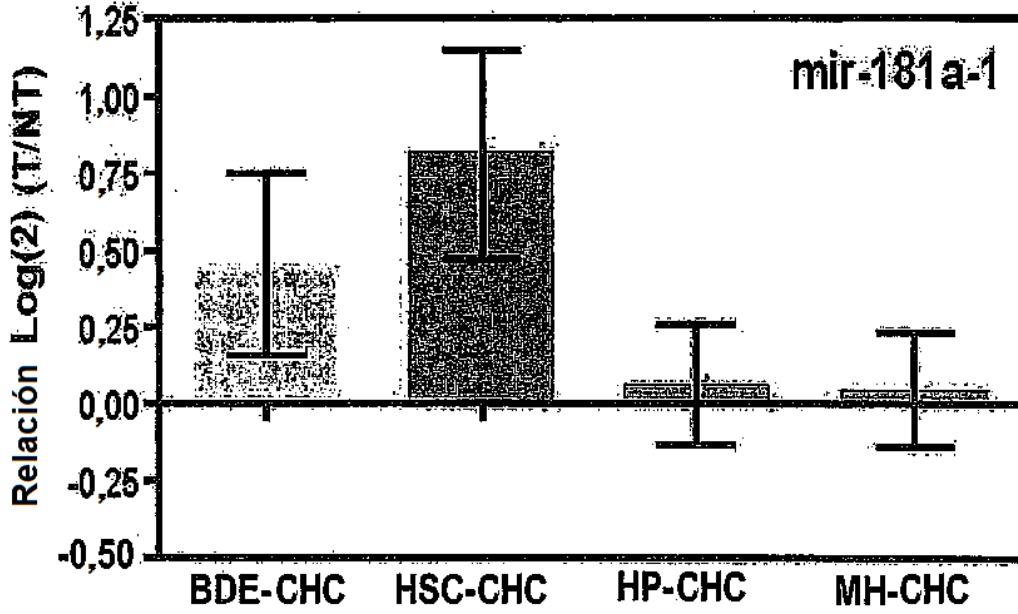


FIG. 1B

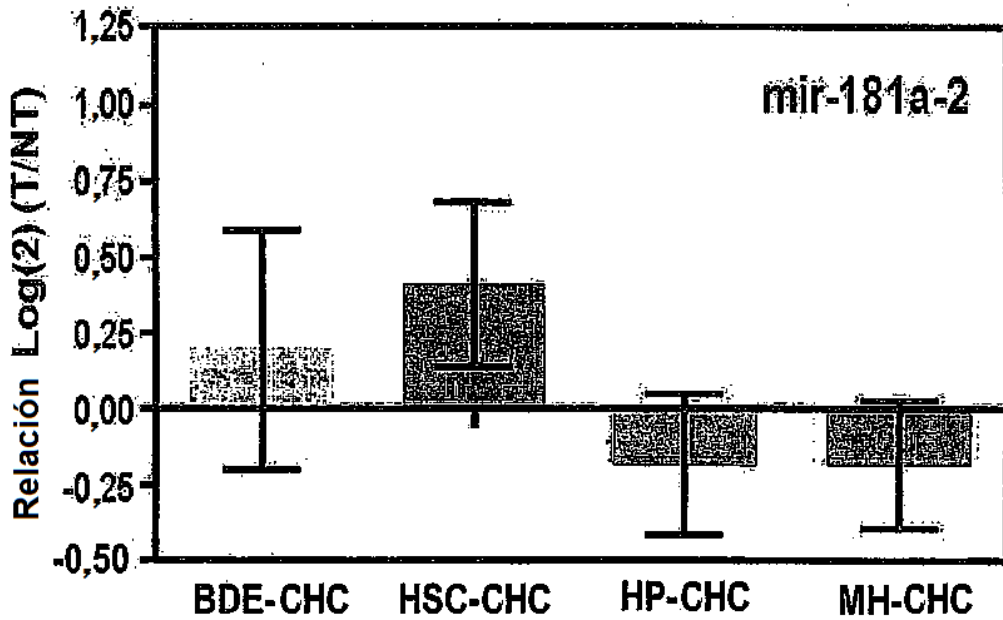




FIG. 1C

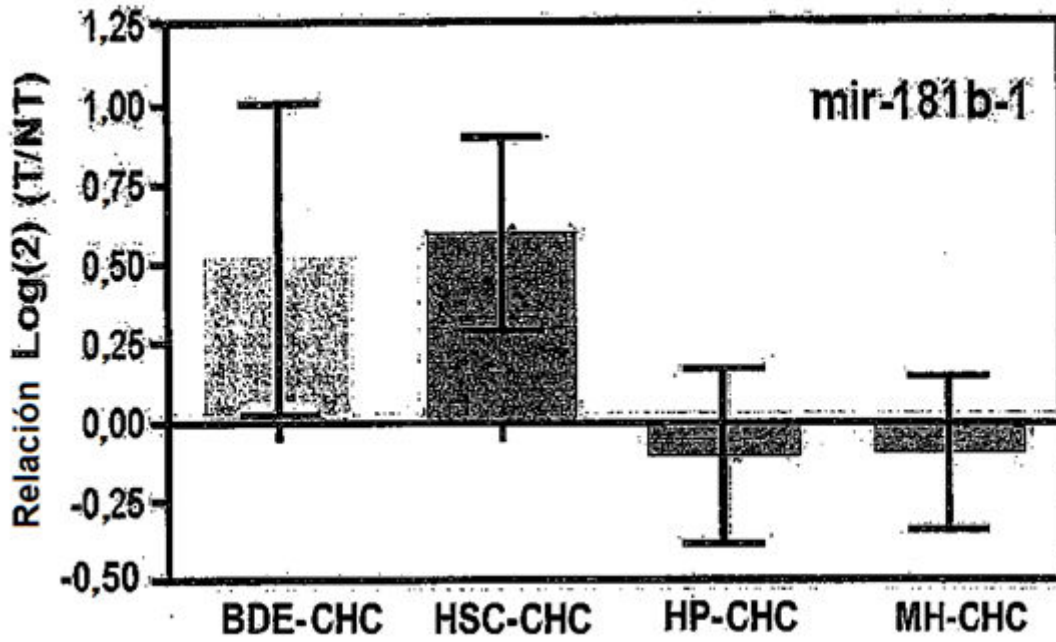


FIG. 1D

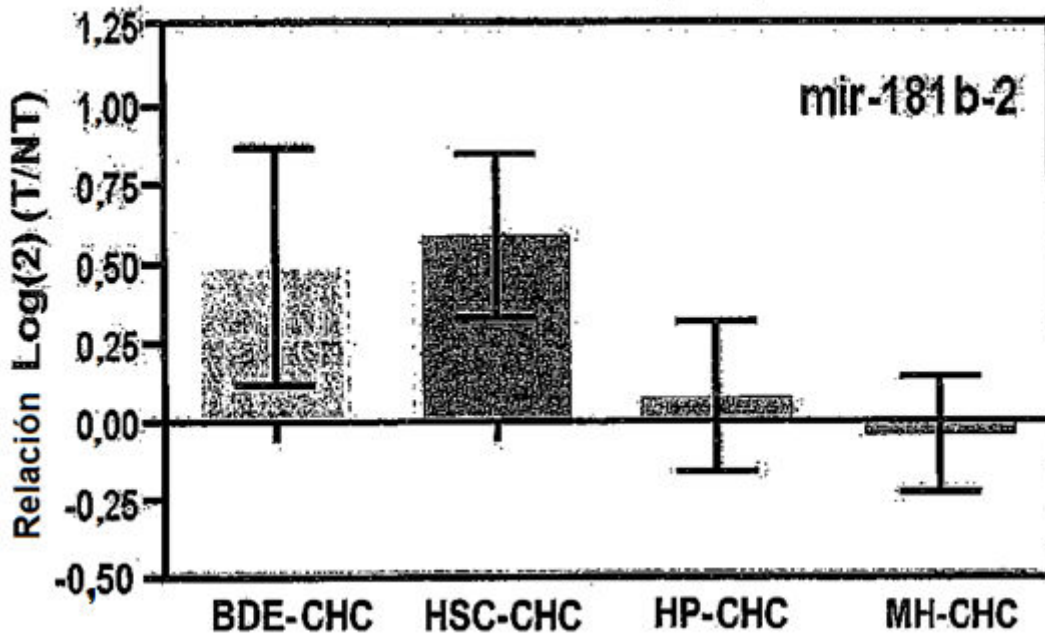


FIG. 1E

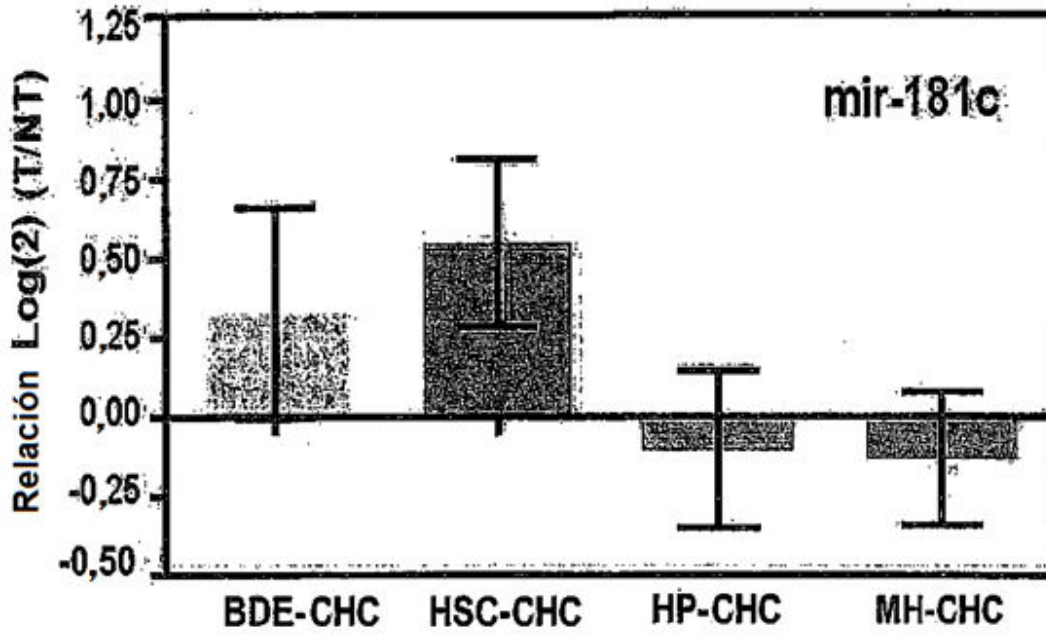


FIG. 1F

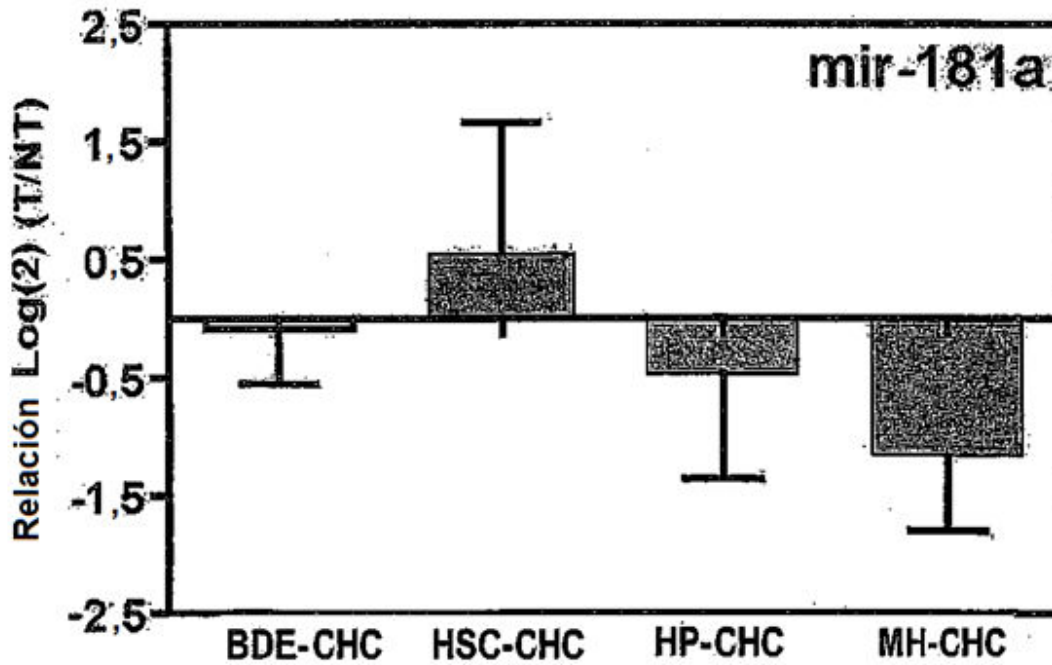


FIG. 1G

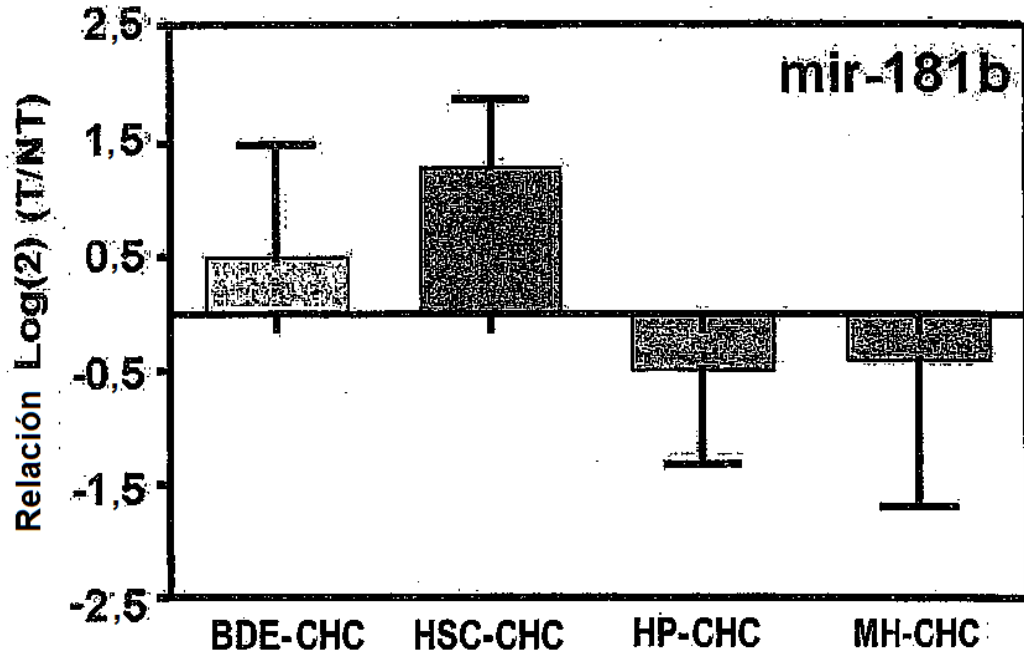


FIG. 1H

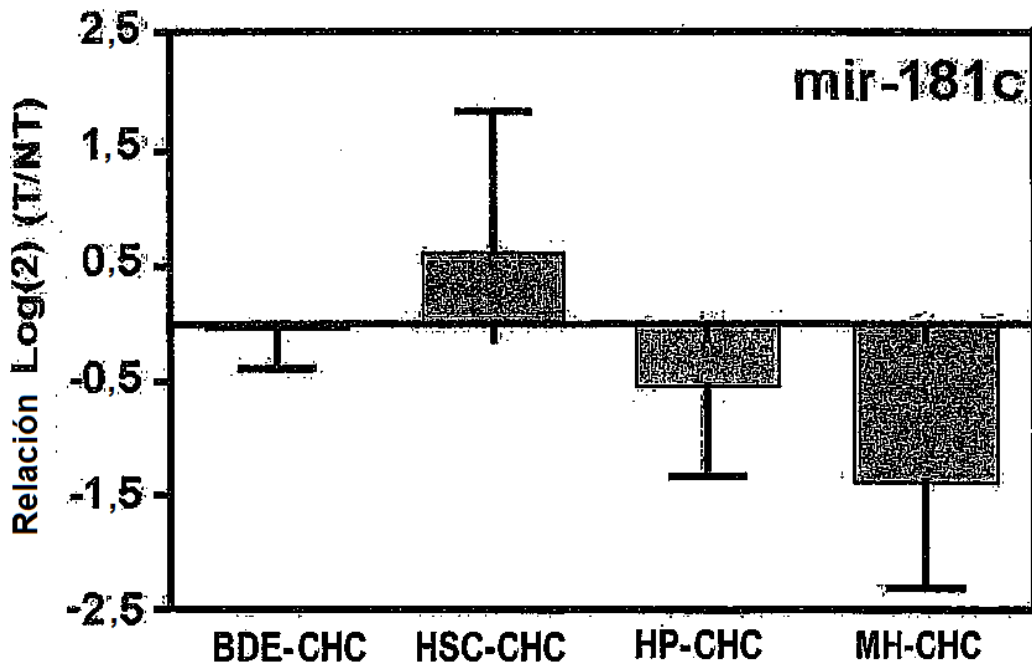


FIG. 1I

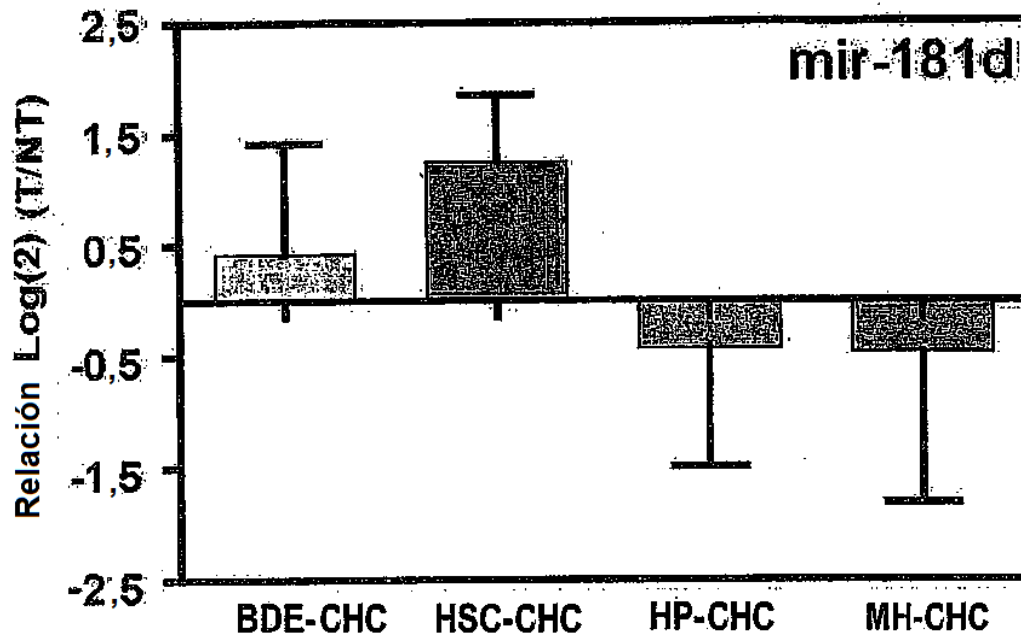


FIG. 1J

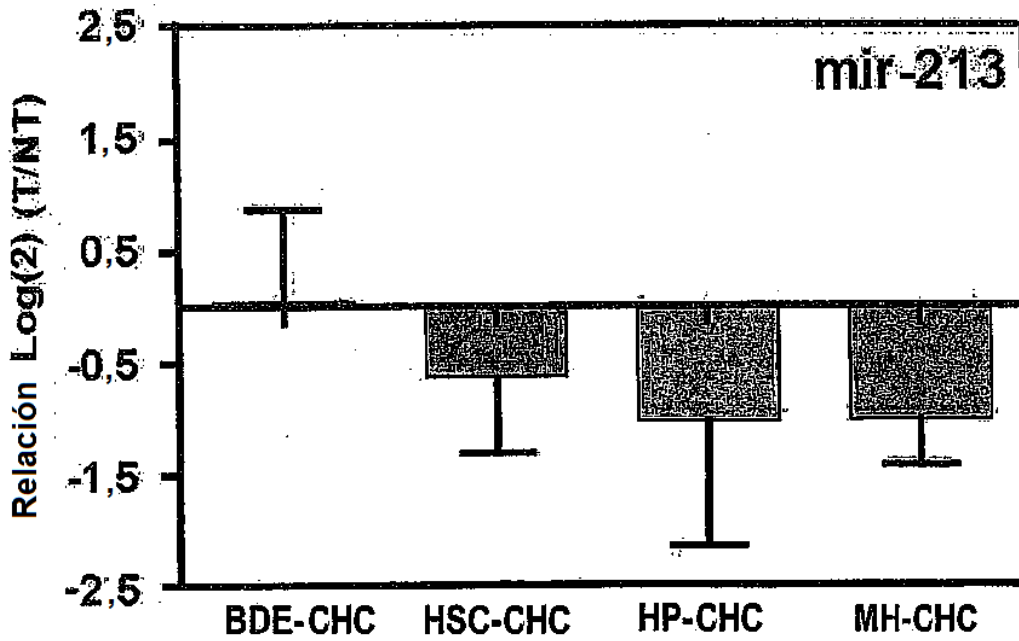


FIG. 2A

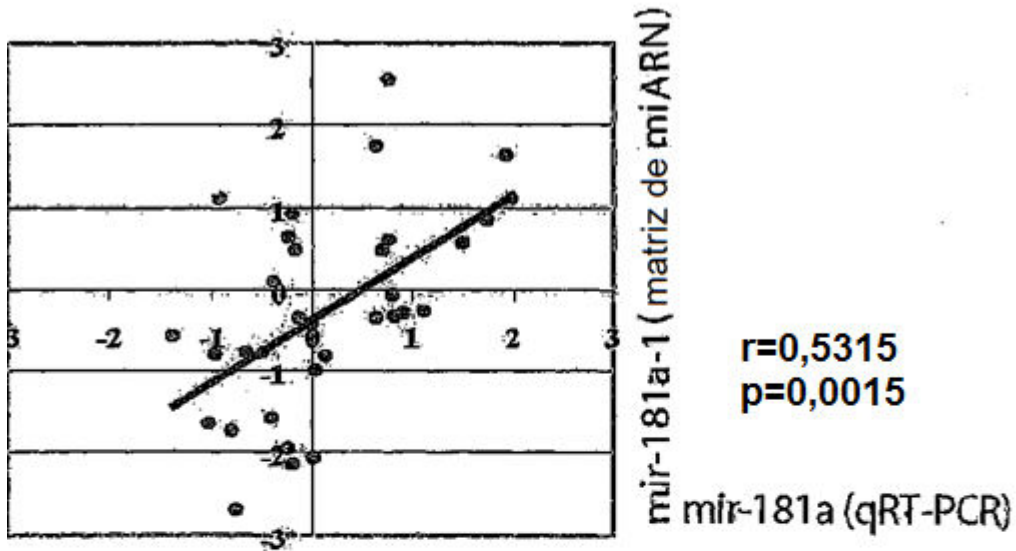


FIG. 2B

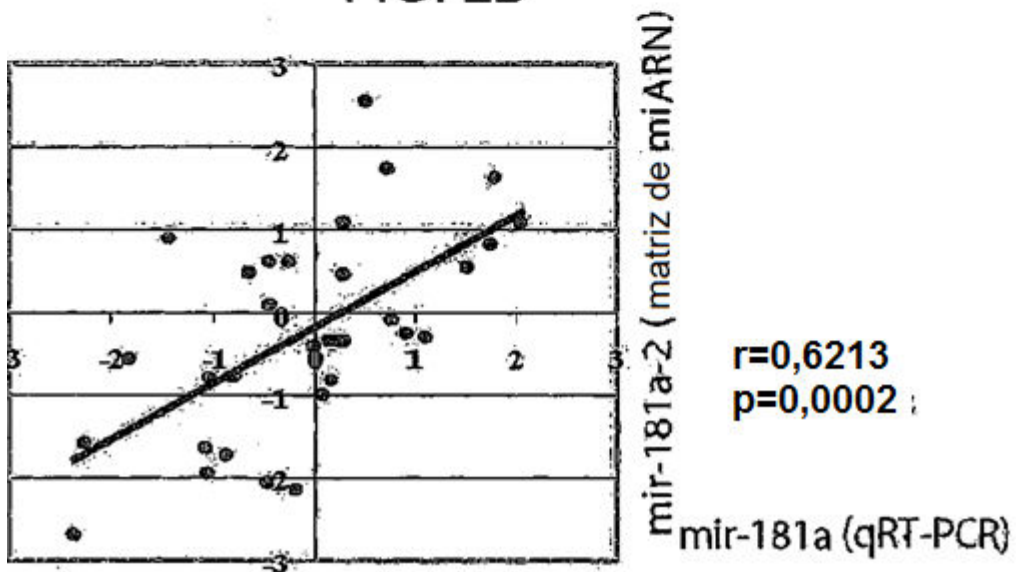


FIG. 2C

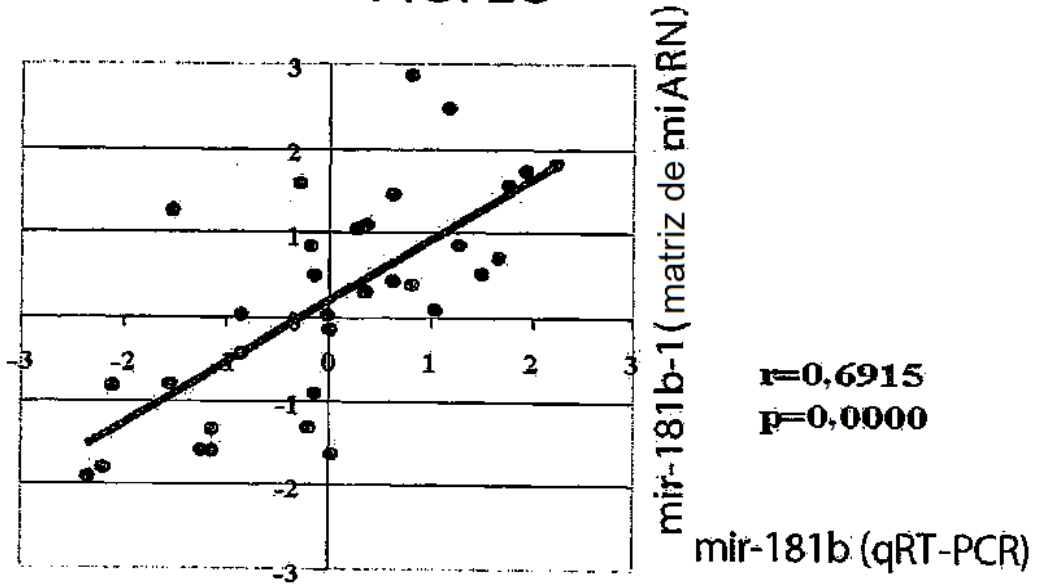


FIG. 2D

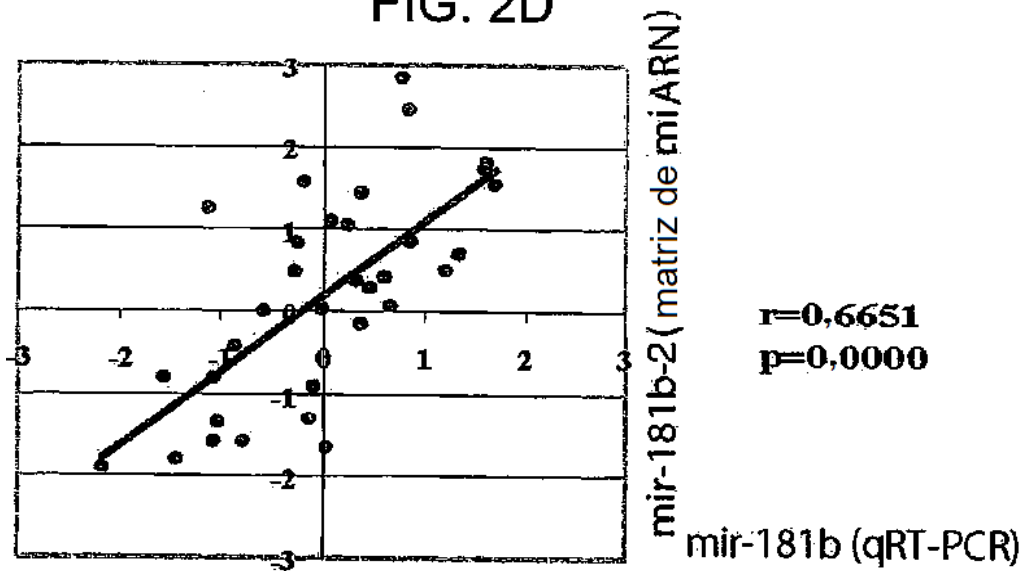


FIG. 2E

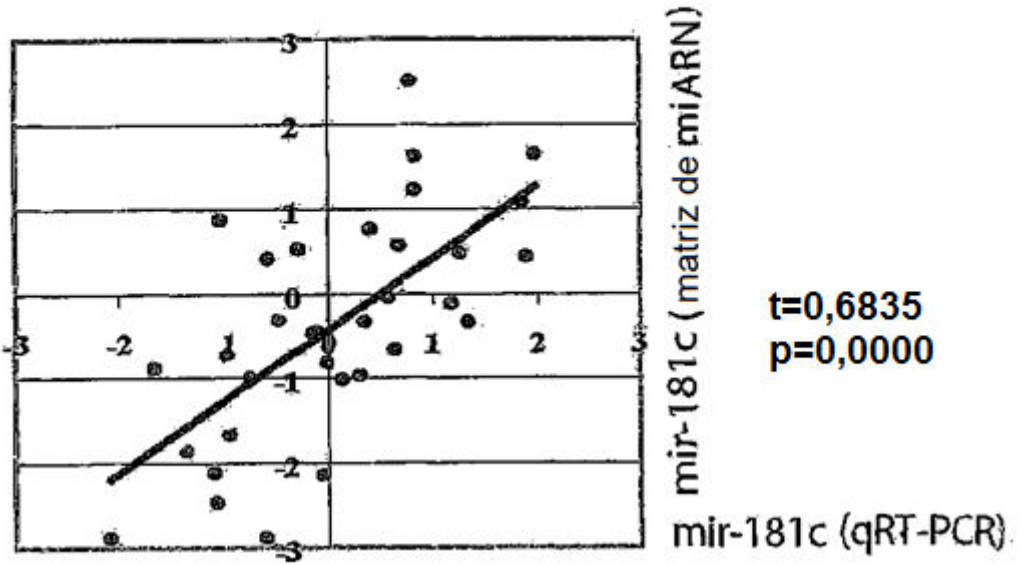


FIG. 3A

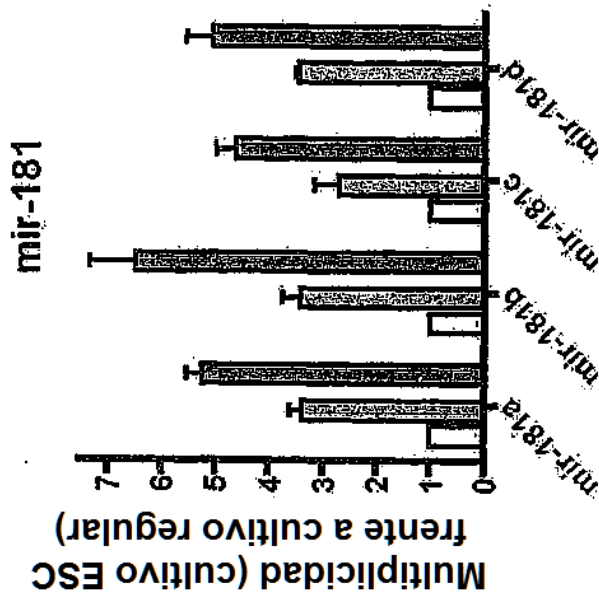


FIG. 3B

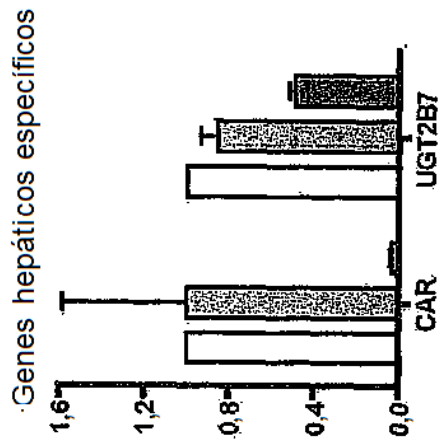
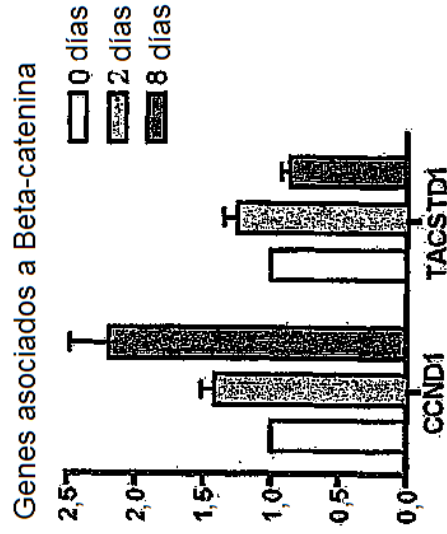
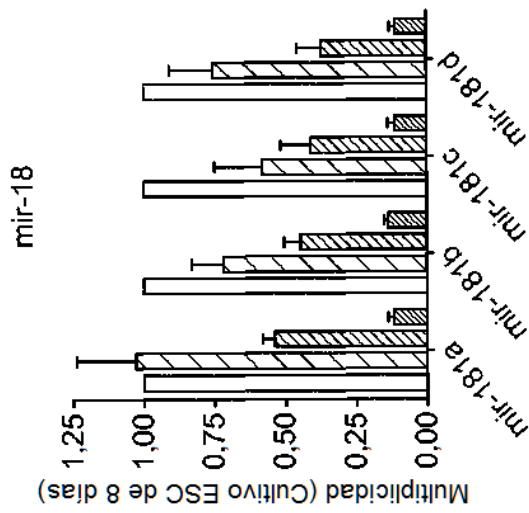


FIG. 3C

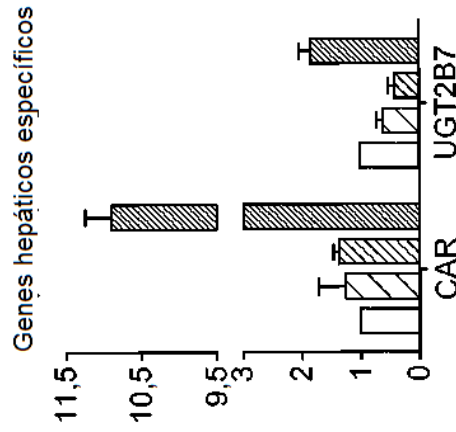




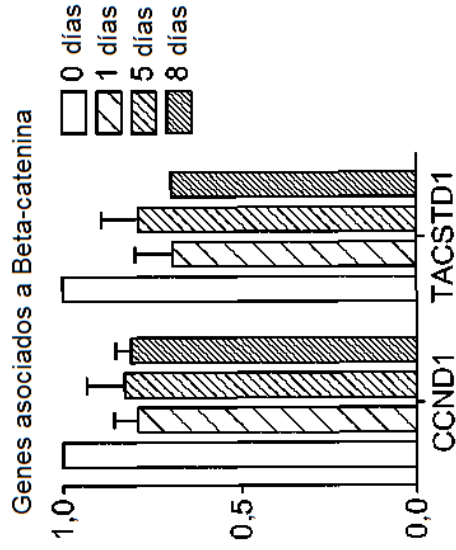
**FIG. 3D**



**FIG. 3E**



**FIG. 3F**



**FIG. 4**

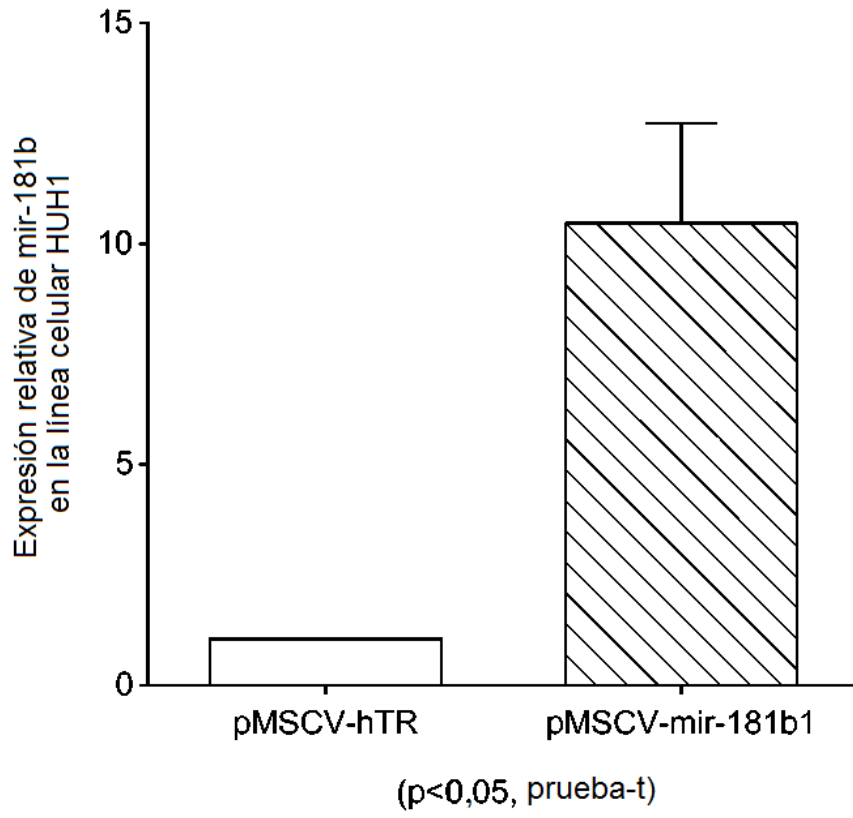
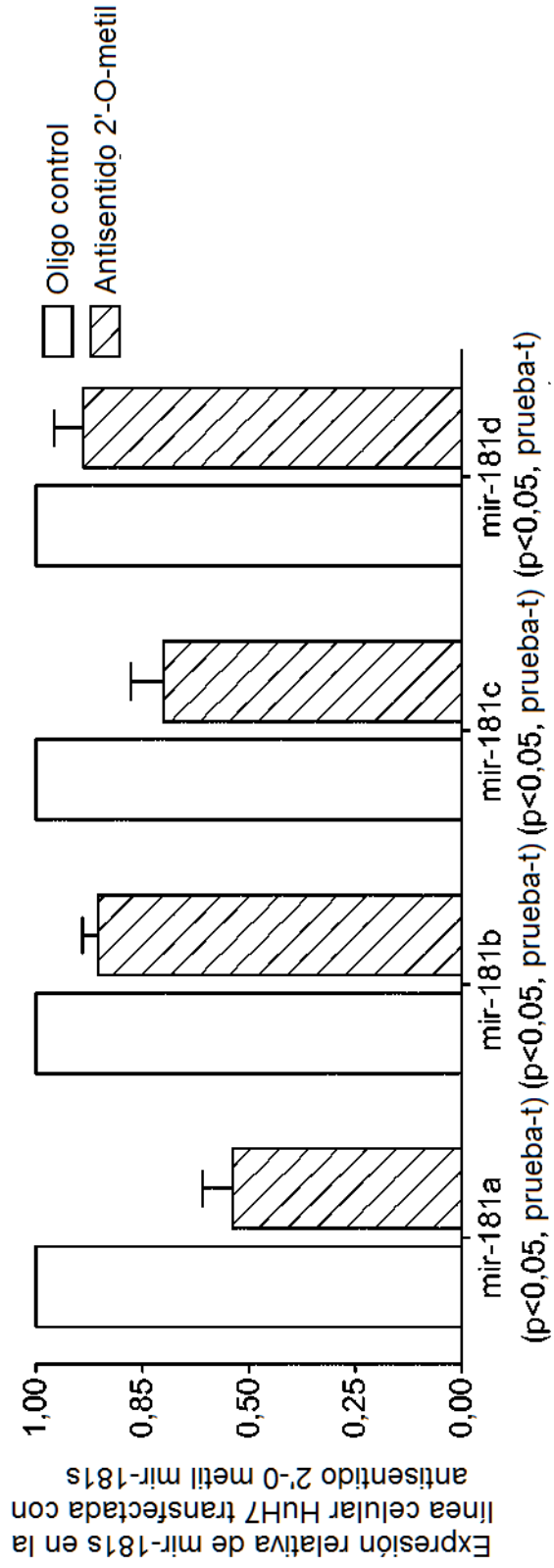
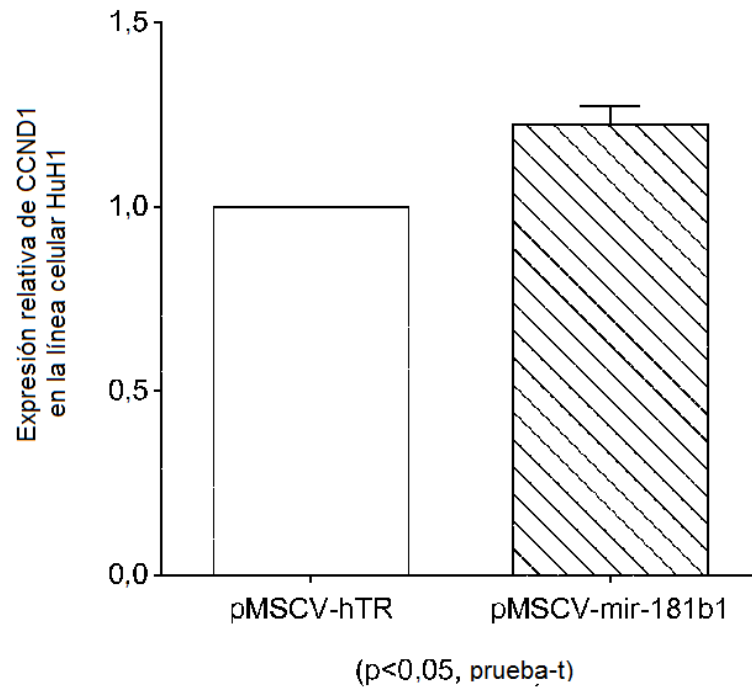


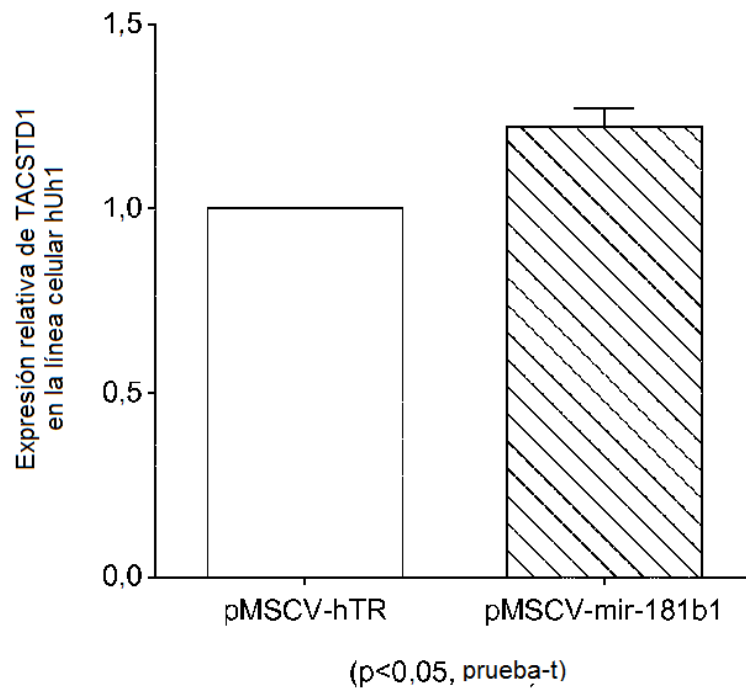
FIG. 5



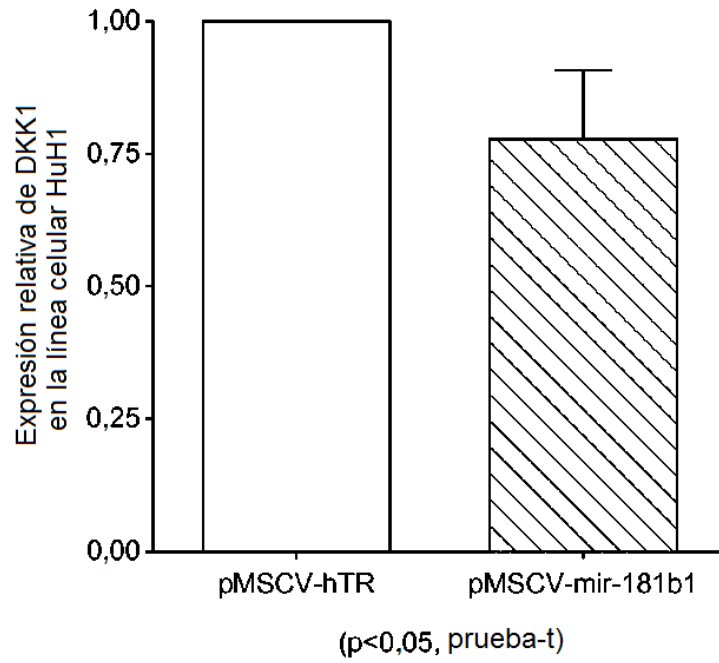
**FIG. 6A**



**FIG. 6B**



**FIG. 6C**



**FIG. 6D**

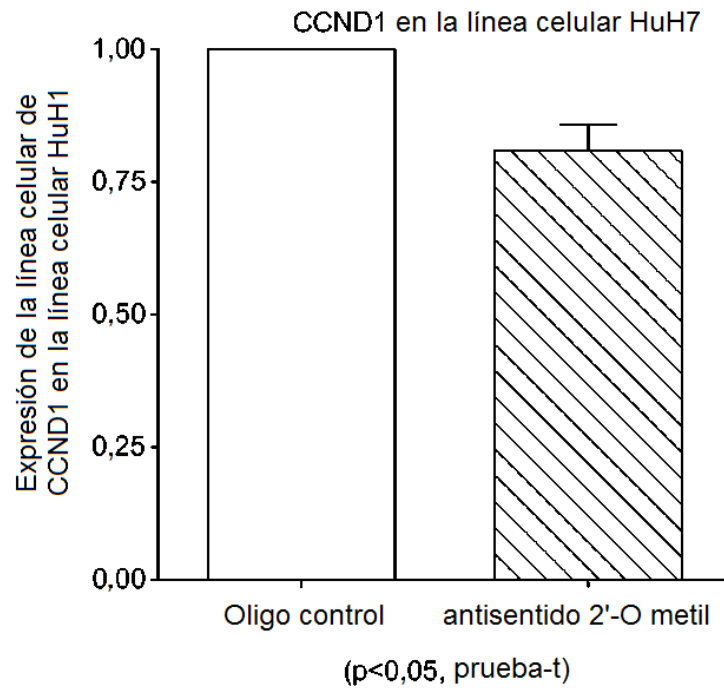


FIG. 6E

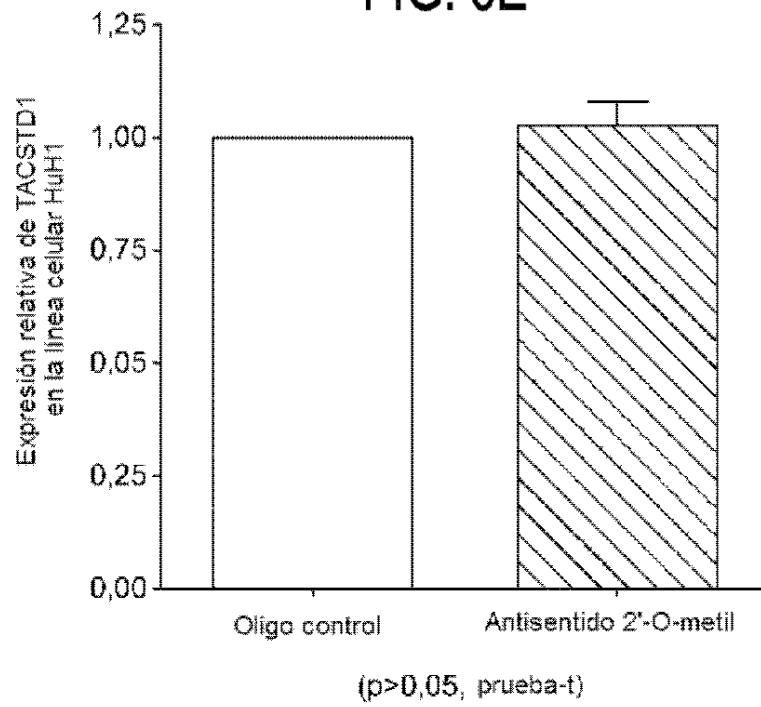
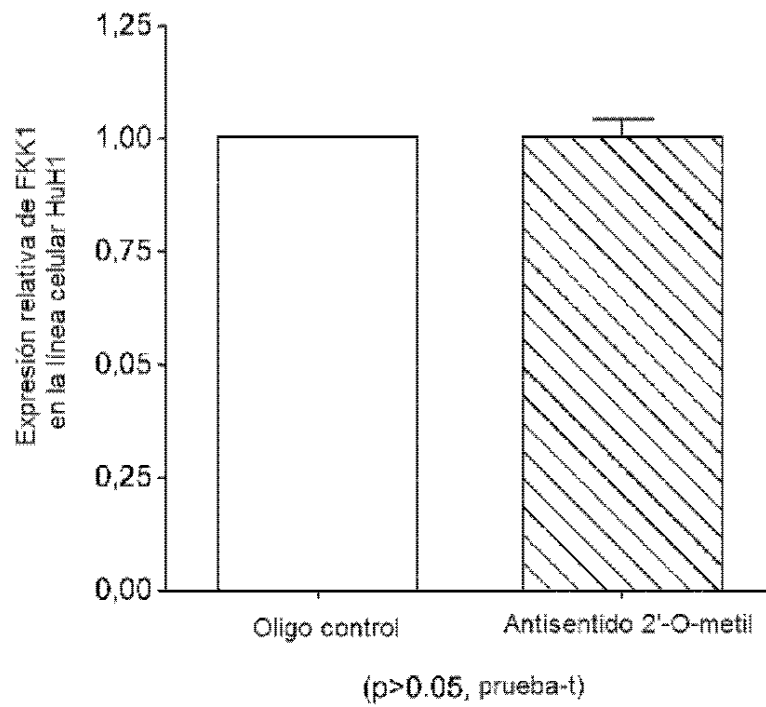


FIG. 6F



### FIG. 7A

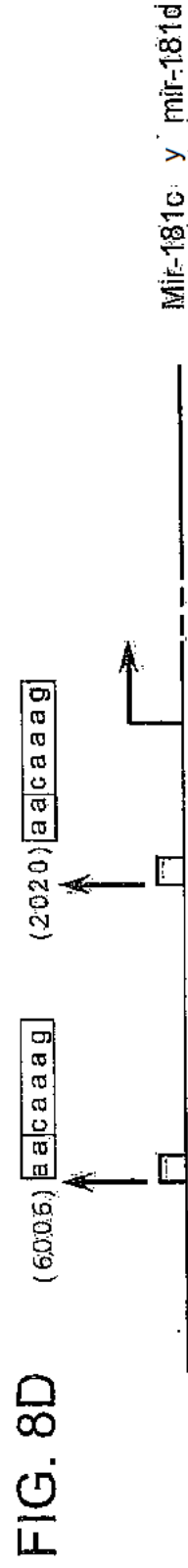
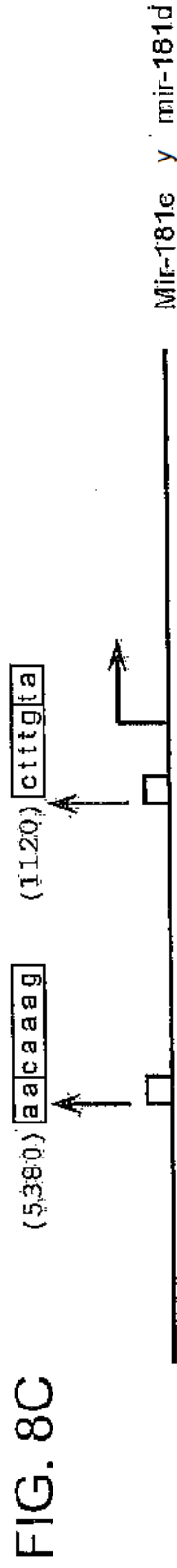
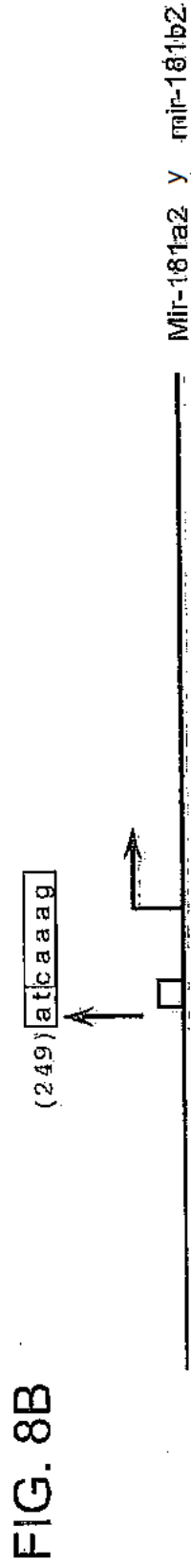
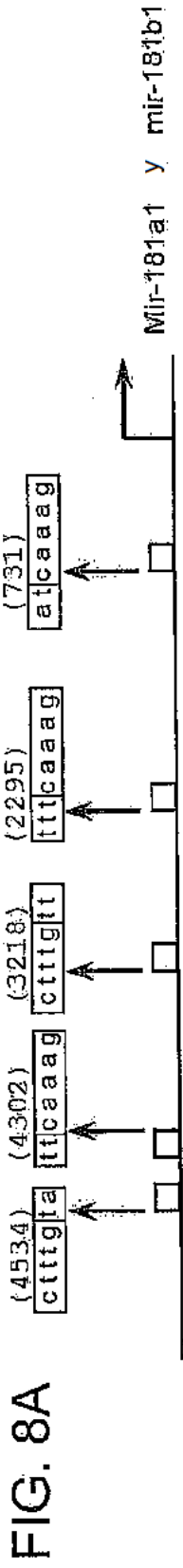
POSICIÓN 611-632 DE LA 3' UTR DE DKK1

----AAUGAUGAU-AGCACC-UUGGAUG----	DKK1
.     .  .            .	
UG--AGUGGCUGUCGCAACUUACAA	mir-181a
----AAUGAUCAUA-GCACC-UUGGAUG----	DKK1
.  .    .  .           .	
G--GGUGGCUGUCGUUACUUACAA	mir-181b
----AAUGAUCA-UAGCACCUUGGAUG----	DKK1
,       .  .            .	
UG--AGUGGCUGUCCAACUUACAA	mir-181c
----AAUGAUCAUA-GCACC-UUGGAUG----	DKK1
.  .    .  .           .	
UUG--GGUGGCUGUUGUACUUACAA	mir-181d

### FIG. 7B

POSICIÓN 771-799 DE LA 3' UTR DE DKK1

----AACCUGUCCUGAAAGAAGGUCAAGUGUGU----	DKK1
...                 .	
UGAGUGGC--UGUCG-CAAC-UUACA-A	mir-181a
----AACCUGUCCUGAAAGAAGGUCAAGUGUGU----	DKK1
...           ..    .	
GGGUGG--CUGUCG-UUAC-UUACA-A	mir-181b
----AACCUGUCCUGAAAGAAGGUCAAGUG  GU----	DKK1
...                .	
UGAGUGG--CUG---UCCAACUUACA-A	mir-181c
----AACCUGUCC-UGAAAGAAGGUCAAGUGUGU----	DKK1
...   ..           .	
UUGGGUGGCUGUUG--UU--A-CUUACA-A	mir-181d





**FIG. 9**

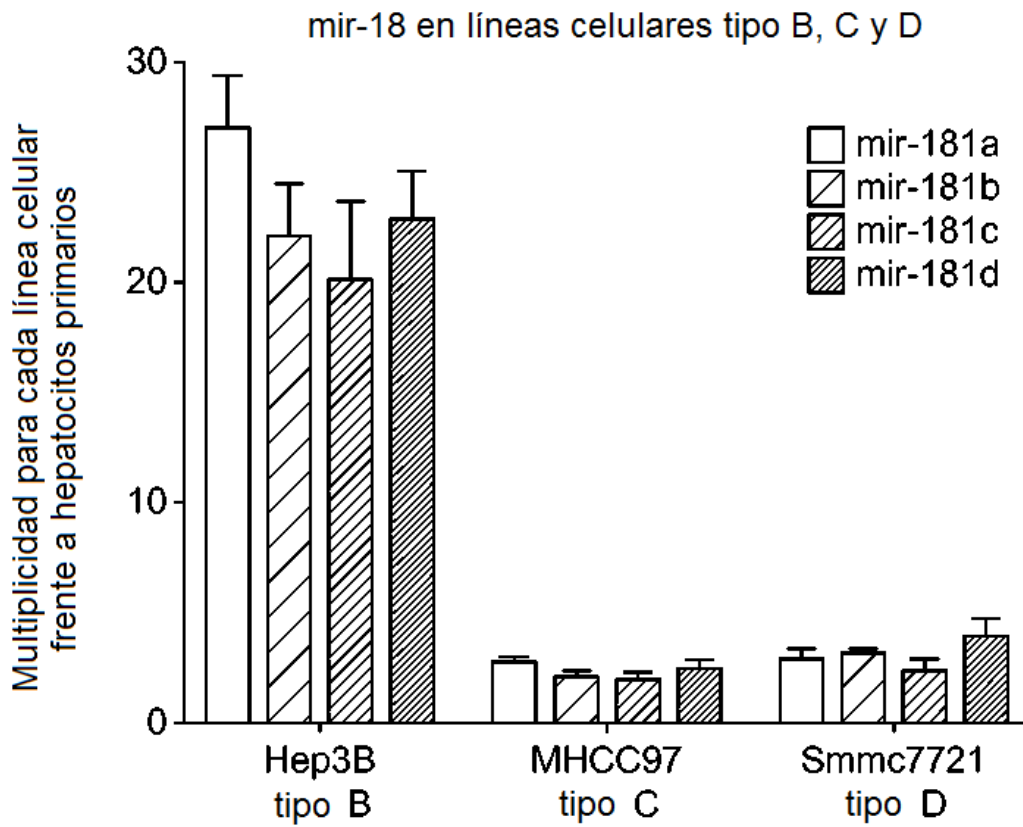


FIG. 10

