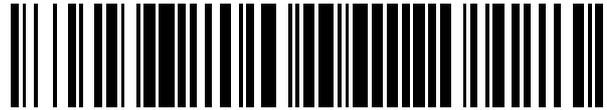


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 607**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2007 E 11196265 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 2436787**

54 Título: **MIR-21 para el diagnóstico de adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia**

30 Prioridad:

**13.07.2006 US 807304 P**  
**01.06.2007 US 932736 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.03.2016**

73 Titular/es:

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

**1524 North High Street**

**Columbus, OH 43201, US y**

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF  
AMERICA AS REPRESENTED BY THE  
SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH  
AND HUMAN SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 562 607 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

MIR-21 para el diagnóstico de adenocarcinoma de colon con mal pronóstico de supervivencia

5 **Antecedentes de la invención**

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

15 Los objetivos terapéuticos ideales deberían asociarse causalmente a enfermedad y ser propensos a diseñar intervenciones terapéuticas; mientras que los biomarcadores ideales deberían ser fáciles de medir y tener fuertes asociaciones con resultados clínicos. Los microARN podrían cumplir ambos criterios<sup>6-8</sup>.

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

30 La expresión aberrante de los microARN puede ser causa de carcinogénesis, la inhibición de microARN específicos puede tener implicaciones terapéuticas. Se pueden diseñar oligonucleótidos antisentido modificados para inhibir específicamente la función del microARN<sup>28</sup>. Los antagomires son un tipo de oligonucleótidos antisentido que se ha demostrado que son eficaces en la inhibición de la función de microARN *in vivo* en ratones<sup>29</sup>. La facilidad de diseño de inhibidores específicos de la función de los microARN les convierte en candidatos a objetivos terapéuticos

35 **Sumario de la invención**

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

En otro aspecto amplio, se proporciona en el presente documento un método de análisis para al menos un inicio de, predisposición a o disminución del pronóstico de supervivencia para una respuesta de la enfermedad relacionada con el cáncer de colon, que comprende:

- 50
- (1) determinar un nivel de expresión de al menos un marcador en una muestra de un sujeto de ensayo; el al menos un marcador incluye al menos un producto génico de miR-21 seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR- 181b, miR-203 y combinaciones de los mismos;
  - 55 (2) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa (1) con un nivel de expresión control del marcador en una muestra de un sujeto sano; y
  - (3) juzgar que el sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon cuando el resultado de la comparación en la etapa (2) indica que: (i) el nivel de expresión del al menos un marcador en el sujeto de ensayo es mayor que en el control; o ii) el nivel de expresión del al menos un marcador en el sujeto de ensayo es menor que en el control.

60 La muestra puede comprender uno o más de tejido, sangre, suero, plasma, suero, orina y heces. Asimismo, todas las etapas del método se pueden realizar *in Vitro*.

65 En otro aspecto amplio, en el presente documento se proporciona un método asistido para diagnosticar si un sujeto tiene un pronóstico de menor supervivencia para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, o está en riesgo de desarrollarla, que comprende:

- (1) transcripción inversa de ARN desde una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana;
- (2) hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende sondas oligonucleotídicas específicas de miRNA-181b para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y
- 5 (3) comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control, en el que una alteración en la señal de al menos un miRNA es indicativa de que el sujeto tiene un pronóstico de menor supervivencia para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, o está en riesgo de desarrollarla.
- 10 En un aspecto concreto, la señal de al menos un miRNA respecto a la señal generada a partir de la muestra control está regulada por aumento o por disminución, Asimismo, la micromatriz puede comprender sondas oligonucleotídicas específicas de miARN para uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-706a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.
- 15 En otro aspecto amplio, en el presente documento se proporciona un método de inhibición de la tumorigénesis en un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, una enfermedad relacionada con cáncer de colon, en el que al menos un producto génico miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos está regulado por disminución o regulado por aumento en las células cancerosas del sujeto, con respecto a las células control, que comprende:
- 20 (1) cuando el al menos un producto génico de miR está regulado por disminución en las células cancerosas, administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR aislado, seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos, de modo que la tumorigénesis en el sujeto está inhibida; o
- 25 (2) cuando el al menos un producto génico de miR está regulado por aumento en las células cancerosas, administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos, de modo que la tumorigénesis en el sujeto está inhibida.
- 30 En un aspecto concreto, el al menos un producto génico de miR aislado en la etapa (1) y/o en la etapa (2) es miR-21 o una variante aislada o fragmento biológicamente activo o equivalente funcional del mismo, o un anticuerpo que se une al mismo.
- 35 En otro aspecto amplio, en el presente documento se proporciona un método de inhibición de la tumorigénesis en un sujeto que tiene cáncer de colon, que comprende:
- (1) determinar la cantidad de al menos un producto génico de miR en células cancerosas del sujeto, con respecto a las células control; y
- 40 (2) alterar la cantidad del producto génico de miR expresado en las células cancerosas mediante:
- (i) administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR aislado, seleccionado del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos, si la cantidad del producto génico de miR expresado en las células cancerosas es inferior a la cantidad del producto génico de miR expresado en las células control; o
- 45 (ii) administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR, si la cantidad del producto génico de miR expresado en las células cancerosas es superior a la cantidad del producto génico de miR expresado en las células control, de modo tal que se inhibe la tumorigénesis en el sujeto.
- 50 En un aspecto concreto, el al menos un producto génico de miR aislado en la etapa (1) es miR-21 o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo. Asimismo, en ciertas realizaciones, el al menos un producto génico de miR en la etapa (ii) se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo de los mismos.
- 55 En otro aspecto amplio, en el presente se proporciona un método de identificación de un inhibidor de la tumorigénesis, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión alterados en una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que un incremento o disminución del nivel del producto génico de miR en la célula, respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de la tumorigénesis
- 60 En otro aspecto amplio, en el presente se proporciona un método de identificación de un inhibidor de la tumorigénesis, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión alterados en una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que una disminución del nivel del producto génico de miR en la célula, respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de la tumorigénesis
- 65

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

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

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

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

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

30 En otro aspecto amplio, en el presente documento se proporciona un circuito de ADN para analizar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, sobre el que una sonda se ha inmovilizado para analizar al menos un marcador descrito en el presente documento.

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

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

40 En ciertas realizaciones, el agente terapéutico candidato comprende uno o más de: composiciones farmacéuticas, composiciones nutracéuticas y composiciones homeopáticas. Asimismo, el tratamiento en evaluación puede ser para usar en un sujeto humano. En determinadas realizaciones, el método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

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

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

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

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

65 En otro aspecto amplio, en el presente documento se proporciona un artículo de fabricación que comprende: al menos un reactivo de captura que se une a un marcador de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon seleccionado de al menos uno de los marcadores descritos en el presente documento.

En otro aspecto amplio, en el presente documento se proporciona un kit para el cribado de un compuesto candidato a un agente terapéutico para tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que el kit comprende: uno o más reactivos de al menos un marcador descrito en el presente documento y una célula que expresa al menos un marcador. En determinadas realizaciones, la presencia del marcador se detecta usando un reactivo que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a al menos un marcador. Asimismo, en determinadas realizaciones, el reactivo está marcado, radiomarcado o marcado con biotina y/o el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima. En una realización concreta, el kit incluye además un contenedor que comprende al menos uno de los marcadores. Asimismo, el reactivo puede comprender uno o más de: un anticuerpo, una sonda a la que el reactivo está unido o se puede unir, y un quilato metálico inmovilizado.

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

poner en contacto uno o más de los marcadores de la reivindicación 20 con un sustrato para dicho marcador y con un agente de ensayo, y determinar si el agente de ensayo modula la actividad del marcador.

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

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

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

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

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

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

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

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

En otro aspecto amplio, en el presente documento se proporciona un medio legible por ordenador que comprende una base de datos que tiene una pluralidad de perfiles de referencia codificados digitalmente, en el que al menos un primer perfil de referencia representa un nivel de al menos un primer marcador en una o más muestras de uno o más sujetos que exhiben indicios de una respuesta de enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que el marcador comprende uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

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

5 En otro aspecto amplio, en el presente documento se proporciona un sistema informático para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, es propenso a sufrirla o tiene un mal pronóstico de supervivencia a ella, que comprende la base de datos descrita en el presente documento y un servidor que comprende un código ejecutable por ordenador para hacer que el ordenador reciba un perfil de un sujeto, identificar de la base de datos un perfil de referencia equivalente que es relevante en términos diagnósticos para el perfil del sujeto y generar una indicación de si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o es propenso a sufrirla.

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

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

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

30 En otro aspecto amplio, en el presente documento se proporciona un modelo animal para el cáncer de colon en el que al menos uno de los siguientes procesos biológicos o químicos se produce en un modelo animal de regulación por aumento o por disminución de uno o más productos génicos de miR se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el modelo animal es un vertebrado no humano. En realizaciones concretas, el animal es un ratón, rata, conejo o primate.

35 Varios objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferida, cuando se lea a la luz de las figuras adjuntas.

#### 40 Breve descripción de las figuras

La patente o archivo de solicitud contiene al menos una figura ejecutada en color. La Oficina entregará copias de la presente patente o publicación de solicitud de patente con figuras a color tras petición y abono de la tarifa necesaria.

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

(Fig. (1a) La hibridación in situ para miR-21 se optimizó para distinguir una expresión alta y baja de miR-21. Las células epiteliales colónicas en tumores humanos (T) expresan niveles más altos de miR-21 en comparación con el tejido no tumoral (N) adyacente. (Fig. 1c) Los núcleos y citoplasmas de las células epiteliales colónicas en tejido tumoral expresan cantidades significativas de miR-21 en tejido tumoral, a alto aumento. (Fig. 1e) El tejido no tumoral no muestra expresión significativa de miR-21 con el mismo aumento.

(Fig. 1b, Fig. 1d, Fig. 1f) La sonda control mixta no muestra tinción significativa con un aumento bajo o alto en secciones seriadas de tejido tumoral y no tumoral, según lo previsto. La barra de escala (Figs. 1c-f) indican que (g) miR-21500  $\mu\text{M}$  se expresa a niveles más altos en tumores más avanzados. Los gráficos de puntos representan valores Ct relativos a miR-21 (de RT-PCR cuantitativa) para los niveles de expresión en adenoma y tumores que se han normalizado con respecto a tejido no adenoma o no tumoral pareado, respectivamente. Los tipos de tejido se han ordenado desde adenoma a tumores en estadio I-IV. Las barras indican la mediana del valor. Existe una tendencia significativa de que los tumores más avanzados tienen una expresión más alta de miR-21 (ensayo no paramétrico para la tendencia a través de grupos ordenados).

60 Figura 2: miR-21 se expresa a niveles más altos en tumores más avanzados. Se usaron micromatrices de microARN para medir los niveles de expresión de miR-21. Los gráficos de puntos representan el  $\log_2$  de miR-21 (proporciones tumor/no tumor) calculado a partir de micromatrices de microARN de la cohorte original. La sonda hsa-miR-21-prec 17No 1 de la micromatriz se usó para medir la expresión de miR-21. Se excluyeron los tejidos con expresión indetectable de miR-21 basada en los datos de la micromatriz. Los tipos de tejido se han ordenado

como tumores TNM en estadio I a estadio IV. Las barras indican la mediana del valor. Existe una tendencia significativa de que los tumores más avanzados tienen una expresión más alta de miR-21 ( $p = 0,04$ ; ensayo no paramétrico para la tendencia a través de grupos ordenados).

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

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

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

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

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

30 (Fig. 4b) Validación de la asociación con expresión alta de miR-21 en tumores y un mal pronóstico en una cohorte independiente. Los niveles de expresión de miR-21 se midieron mediante RT-PCR cuantitativa. La expresión alta se basa en el tercil más alto. 37/111 tejidos no tumorales se clasificaron como altos y 37/111 tejidos tumorales se clasificaron como altos. Todos los valores P son valores p del orden logarítmico del análisis de Kaplan-Meier. Las X en todas las líneas indican el momento en el que se censuró a un individuo.

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

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

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

50 (Fig. 5c) Comparación de sujetos con TNM en estadio III con histología convencional de adenocarcinoma. Para los 44 sujetos en estadio III, 17 se clasificaron como expresión baja de miR-21 que reciben tratamiento, 13 como expresión baja de miR-21 y que no reciben tratamiento, 8 como expresión alta que reciben tratamiento y 6 como expresión alta y que no reciben tratamiento. Para los sujetos en estadio III que recibieron quimioterapia adyuvante, la expresión alta de miR-21 en tumores está asociada a una supervivencia mala ( $p = 0,02$ ). Las X en todas las líneas indican el momento en el que se censuró a un individuo.

55 Figuras 6a, 6b y 6c: Análisis combinado de la cohorte del ensayo de Maryland y cohorte de validación de Hong

Kong que analiza asociaciones entre la expresión de miR-21 en tumores y recepción de quimioterapia adyuvante con pronóstico. Este análisis incluye todos los sujetos con TNM en estadio II/III de ambas cohortes. Se excluyó a los sujetos con histología de adenocarcinoma mucinoso o carcinoma adenoescamoso. La columna de la izquierda incluye gráficos de Kaplan-Meier que analiza la asociación entre la recepción de tratamiento adyuvante y el pronóstico. La columna del dentro incluye el análisis de la asociación entre niveles de expresión alta de miR-21 en tumores y el pronóstico y la columna de la derecha subdivide a los individuos basándose en la quimioterapia y al estado de expresión de miR-21.

(Fig. 6a) Todos los sujetos en estadio II/III. Para los 119 sujetos en estadio II/III, 40 se clasificaron como expresión baja de miR-21 que reciben tratamiento, 41 como expresión baja de miR-21 y que no reciben tratamiento, 16 como expresión alta que reciben tratamiento y 22 como expresión alta y que no reciben tratamiento. La expresión alta de miR-21 se asocia a una mala supervivencia para los que reciben quimioterapia ( $p = 0,003$ ) así como para aquéllos que no reciben tratamiento ( $p = 0,04$ ).

(Fig. 6b) Todos los sujetos en estadio II. Para los 52 sujetos en estadio II/III, 10 se clasificaron como expresión baja de miR-21 que reciben tratamiento, 25 como expresión baja de miR-21 y que no reciben tratamiento, 4 como expresión alta que reciben tratamiento y 13 como expresión alta y que no reciben tratamiento. Las asociaciones entre expresión alta de miR-21 y el pronóstico no fueron estadísticamente significativas en los individuos que recibieron quimioterapia ( $p = 0,11$ ) ni en aquéllos que no recibieron quimioterapia ( $p = 0,06$ ).

(Fig. 6c) Todos los sujetos de TNM en estadio III. Para los 67 sujetos en estadio III, 30 se clasificaron como expresión baja de miR-21 que reciben tratamiento, 16 como expresión baja de miR-21 y que no reciben tratamiento, 12 como expresión alta que reciben tratamiento y 9 como expresión alta y que no reciben tratamiento. La expresión alta de miR-21 se asocia significativamente a una mala supervivencia en los sujetos en estadio III que recibieron quimioterapia ( $p = 0,007$ ), pero no en los sujetos ni que no recibieron quimioterapia ( $p = 0,30$ ). Las X en todas las líneas indican el momento en el que se censuró a un individuo.

Figuras 7a - 7c. Los perfiles de miARN globales se asocian a una estadificación clínica de TNM y el pronóstico de la supervivencia. El agrupamiento jerárquico de las proporciones miARN TIN tuvieron como resultado la formación de dos grupos denominados de forma arbitraria grupo A y grupo B. El mapa HEAR resultante y las asignaciones de grupos se muestran en la Fig. 7a. Estos dos grupos estaban compuestos por individuos con pronósticos de supervivencia significativamente diferentes para la estadificación de TNM, teniendo los individuos del grupo B muy probablemente un pronóstico de estadio III o IV en comparación con los individuos del grupo A (Fig. 7b). El análisis de Kaplan-Meier muestra que los individuos del grupo B también tienen un peor pronóstico de la supervivencia (Fig. 7c).

Figuras 8a - 8i. Las proporciones TIN de miARN individuales son predictivas del pronóstico de la supervivencia. Se presentan gráficos que muestran proporciones TIN por estadificación de TNM (izquierda) y análisis de Kaplan-Meier (derecha) para cada uno de estos 9 miARN. El eje Y (proporción TIN por gráficos de la estadificación del TNM) indica la proporción TIN transformada por  $\log(2)$  para cada individuo, mientras que el eje Y agrupa a los individuos por estadificación del TNM (I, II, III o IV). Los valores de significación mostrados son el resultado de un ensayo no paramétrico para la tendencia de los valores medios de la proporción TIN a través de individuos agrupados por estadificación. Los gráficos de Kaplan-Meier incluyen todos los individuos con datos de proporción TIN para dicho miARN concreto. Los inventores han encontrado que las proporciones de TIN se asociaban tanto a la estadificación clínica como al pronóstico de la supervivencia.

Figuras 9a y 9b. Una firma de miARN de 9 miARN predice el riesgo de morir de cáncer de colon. Se demostró que las proporciones TIN de miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-16b, miR-203, let-7g, miR-29a, miR-103-2 y miR-10a eran cada una predictivas de pronóstico del cáncer de colon. La agrupación jerárquica de las proporciones TIN de estos 9 miARN tuvo como resultado la división de los individuos en dos grupos (1A) con pronóstico de supervivencia significativamente (1B). Grupo B en el que los individuos presentaban un riesgo significativamente más alto de morir por cáncer de colon que los del grupo A. Se excluyó del análisis a los individuos si les faltaban 2 de las 9 proporciones TIN que conforman la firma de miARN.

## 55 Descripción detallada de la realización preferida

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

Como se usa en el presente documento de forma intercambiable, un "producto génico de miR", "microARN" o "miR" o "miARN" se refiere al transcrito de ARN procesado (p. ej., maduro) o sin procesar (p. ej., precursor) de un gen miR. Dado que los productos del gen miR no se traducen en proteína, el término "productos génicos de miR" no incluye proteínas. El transcrito del gen miR sin procesar también se denomina "precursor de miR" o "prec de miR", y normalmente comprende un transcrito de ARN de aproximadamente 70-100 nucleótidos de longitud. El precursor de miR se puede procesar mediante digestión con una ARNasa (por ejemplo, Dicer, Argonaut, o ARNasa III (p. ej.,

ARNasa III de *E. coli*) en una molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos. Esta molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos también se denomina transcrito del gen miR “procesado” o miARN “maduro”.

5 La molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos se puede obtener del precursor del precursor de miR a través de rutas de procesamiento naturales (p. ej., usando células intactas o lisados celulares) o mediante rutas de procesamiento sintéticas (p. ej., usando enzimas de procesamiento aisladas, tales como Dicer, Argonaut o ARNasa III aisladas). Se entiende que la molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos también se puede producir directamente mediante síntesis biológica o química sin tener que haberla procesado desde el precursor de miR.  
10 Cuando en el presente documento se hace referencia a un microARN por su nombre, el nombre corresponde tanto al precursor como a la forma madura, a menos que se indique lo contrario.

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

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

La enfermedad relacionada con el cáncer de colon puede ser cualquier trastorno o cáncer que aparece en los tejidos del colon. Dichos cánceres normalmente se asocian a la formación y/o presencia de masas tumorales y pueden ser, por ejemplo, adenocarcinomas.

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

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

El nivel de al menos un producto génico de miR se puede medir en una muestra biológica (p. ej., células, tejidos) obtenida del sujeto. Por ejemplo, se puede extraer una muestra de tejido (p. ej., de un tumor) de un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon mediante técnicas de biopsia convencionales. En una realización, se puede extraer una muestra de sangre del sujeto y las células sanguíneas (p. ej., glóbulos blancos) se pueden aislar para extracción del ADN mediante técnicas estándar. La muestra de sangre o de tejido se obtiene, preferentemente, del sujeto antes del inicio de la radioterapia, la quimioterapia u otro tratamiento terapéutico. Se puede obtener una correspondiente muestra control de tejido o de sangre de tejidos no afectados del sujeto, de un ser humano normal individual o de una población de individuos normales, o de células cultivadas correspondientes a la mayoría de las células en la muestra del sujeto. Después, la muestra de tejido control o de sangre se procesa junto con la muestra del sujeto, de modo que los niveles de producto génico de miR producido a partir de un gen miR dado en células de la muestra del sujeto se puede comparar con los correspondientes niveles del producto génico de miR de las células de la muestra control. Una expresión del miR de referencia estándar para la muestra biológica también se puede usar como control.

Una alteración (p. ej., un incremento o disminución) en el nivel de un producto génico de miR en la muestra obtenida del sujeto, con respecto al nivel de un correspondiente producto génico de miR en una muestra control, es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el sujeto.

50 En una realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del correspondiente producto génico de miR en la muestra control (es decir, la expresión del producto génico de miR está “regulada por aumento”). Como se usa en el presente documento, la expresión de un producto génico de miR está “regulada por aumento” cuando la cantidad de producto génico de miR en una muestra de célula o tejido de un sujeto es superior a la cantidad del mismo producto génico en una muestra control de célula o tejido.

60 En otra realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del correspondiente producto génico de miR en la muestra control (es decir, la expresión del producto génico de miR está “regulada por disminución”). Como se usa en el presente documento, la expresión de un gen miR está “regulada por disminución” cuando la cantidad de producto génico de miR producido a partir de dicho gen en una muestra de célula o tejido de un sujeto es inferior a la cantidad producida a partir del mismo gen en una muestra control de célula o tejido.

65 La expresión relativa del gen miR en las muestras control y normal se puede determinar con respecto a uno o más patrones de expresión de ARN. Los patrones pueden comprender, por ejemplo, un nivel de expresión del gen miR de cero, el nivel de expresión del gen miR en tejidos no afectados del sujeto o el nivel medio de expresión del gen

miR obtenido previamente para una población de controles humanos normales.

5 El nivel de un producto génico de miR en una muestra se puede medir usando cualquier técnica que sea adecuada para detectar niveles de expresión de ARN en una muestra biológica. Técnicas adecuadas (p. ej., análisis de transferencia Northern, RT-PCR, hibridación *in situ*) para determinar los niveles de expresión de ARN en una muestra biológica (p. ej., células o tejidos) son bien conocidas para los expertos en la técnica. En una realización concreta, el nivel de al menos un producto génico de miR se detecta usando análisis de transferencia Northern. Por ejemplo, el ARN celular total se puede purificar a partir de las células mediante homogeneización en presencia de tampón de extracción de ácido nucleico, seguido de centrifugación. Los ácidos nucleicos se precipitan y el ADN se elimina mediante tratamiento con ADNasa y precipitación. Después, las moléculas de ARN se separan mediante electroforesis en gel sobre geles de agarosa de acuerdo con técnicas estándar y se transfieren a filtros de nitrocelulosa. El ARN se inmoviliza después sobre los filtros mediante calentamiento. La detección y cuantificación del ARN específico se consigue usando sondas de ADN o de ARN adecuadamente marcadas 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.

20 Se pueden producir sondas adecuadas para hibridación de transferencia de tipo Northern de un producto génico de miR dado a partir de las secuencias de ácido nucleico e incluyen, entre otras, sondas que tienen una complementariedad de al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o completa con un producto génico de miR de interés. Los métodos para la preparación de sondas de ADN y de ARN marcadas y las condiciones de hibridación de las mismas a secuencias nucleotídicas 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.

25 En un ejemplo no limitante, 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 del par de unión específica para un ligando marcado (p. ej., biotina, avidina o un anticuerpo), una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, una enzima o similar.

30 Las sondas se pueden marcar a una actividad específica elevada mediante el método de desplazamiento de mella de Rugby *et al.* (1977), *J. Mol. Biol.* 113:237-251 o mediante el método de cebado aleatorio de Fienberg *et al.* (1983), *Anal. Biochem.* 132:6-13. Este último es el método de elección para sintetizar sondas marcadas con <sup>32</sup>P de actividad específica alta a partir de moldes de ADN monocatenario o de ARN. Por ejemplo, sustituyendo los nucleótidos preexistentes con nucleótidos altamente radioactivos de acuerdo con el método de desplazamiento de mella, es posible preparar sondas de ácido nucleico marcadas con <sup>32</sup>P con una actividad específica muy superior a 10<sup>8</sup> cpm/microgramo. La detección autorradiográfica de la hibridación se puede realizar después exponiendo los filtros hibridados a una película fotográfica. La densitometría de las películas fotográficas expuestas mediante los filtros hibridados proporciona una medición precisa de los niveles del transcrito del gen miR. Usando otro enfoque, los niveles del transcrito del gen miR se pueden cuantificar mediante sistemas de imagen computarizada, tal como Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager disponible en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

45 Cuando el marcaje con radionúclidos de las sondas de ADN o de 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)desoxiuridina trifosfato, en la molécula de sonda. El oligonucleótido de sonda biotinilado se puede detectar mediante reacción con proteínas de unión a biotina, tales como avidina, estreptavidina y anticuerpos (p. ej., anticuerpos anti-biotina) acopladas a pigmentos fluorescentes o enzimas que producen reacciones de color.

50 Además de las técnicas Northern y otras de hibridación de ARN, determinar los niveles de los transcritos de ARN se puede conseguir usando la técnica de la hibridación *in situ*. Esta técnica requiere menos células que la técnica de transferencia Northern e implica depositar células enteras sobre un cubre de microscopio y sondar el contenido de ácido nucleico de la célula con una solución que contiene sondas de ácido nucleico radioactivo o marcado de otro modo (p. e., ADNc o ARN). Esta técnica es particularmente adecuada para analizar muestras de biopsia de tejidos procedentes de sujetos. La práctica de la técnica de hibridación *in situ* se describe con más detalle en la patente de EE.UU. Nº 5.427.916.

55 En un ejemplo no limitante, se pueden producir sondas adecuadas para hibridación *in situ* de un producto génico de miR dado a partir de las secuencias de ácido nucleico e incluyen, entre otras, sondas que tienen una complementariedad de al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o completa con un producto génico de miR de interés, como se ha descrito con anterioridad.

60 El número relativo de transcritos del gen miR en las células también se puede determinar mediante transcripción inversa de los transcritos del gen miR, seguido de amplificación de los transcritos sometidos a transcripción inversa mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los niveles de los transcritos del gen miR se pueden cuantificar en comparación con un patrón interno, por ejemplo el nivel de ARNm de un gen "doméstico" presente en la misma muestra. Un gen "doméstico" adecuado para usar como patrón interno incluye, por ejemplo, miosina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los métodos para realizar una RT-PCR cuantitativa y

65

semicuantitativa, y variaciones de los mismos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En algunos casos, puede ser deseable determinar de forma simultánea el nivel de expresión de una pluralidad de diferentes productos génicos de miR en una muestra. En otros casos, puede ser deseable determinar el nivel de expresión de los transcritos de todos los genes miR conocidos con un cáncer. Evaluar los niveles de expresión específicos de cáncer para cientos de genes miR o productos génicos de miR consume tiempo y requiere una gran cantidad de ARN total (al menos 20 µg para cada transferencia Northern) y técnicas autorradiográficas que requieren isótopos radioactivos.

Para superar estas limitaciones se puede construir una oligobiblioteca en formato de microchip (es decir, una micromatriz) que contenga un conjunto de sondas oligonucleotídicas (p. ej., oligodesoxinucleótidos) que sean específicas de un grupo de genes miR. Usando dicha micromatriz, el nivel de expresión de múltiples microARN en una muestra biológica se puede determinar mediante transcripción inversa de los ARN para generar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana e hibridarlos con sondas oligonucleotídicas sobre la micromatriz para generar un perfil de hibridación, o de expresión. Después, el perfil de hibridación de la muestra de ensayo se puede comparar con el de una muestra control, para determinar qué microARN tienen un nivel de expresión alterado células de cáncer sólido.

Como se usa en el presente documento, "sonda oligonucleotídica" o "sonda oligodesoxinucleotídica" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridar con un oligonucleótido diana. "Oligonucleótido diana" u "oligodesoxinucleótido diana" se refiere a una molécula que se va a detectar (p. ej., mediante hibridación). Con "sonda oligonucleotídica específica de miR" o "sonda oligodesoxinucleotídica específica de un miR" se quiere decir una sonda oligonucleotídica que tiene una secuencia seleccionada para hibridar con un producto génico de miR específico o a un transcrito inverso del producto génico de miR específico.

Un "perfil de expresión" o "perfil de hibridación" de una muestra concreta es, esencialmente, una huella del estado de la muestra; mientras que dos estados pueden tener un gen concreto expresado de forma similar, la evaluación de una serie de genes de forma simultánea permite la generación de un perfil de expresión génica único para el estado de la célula. Es decir, el tejido normal se puede distinguir de tejido canceroso (p. ej., un tumor) y de entre varios tejidos cancerosos se pueden determinar diferentes estados pronósticos (por ejemplo, perspectivas de supervivencia buena o mala a largo plazo). Comparando los perfiles de expresión del tejido de cáncer de colon en diferentes estados se obtiene la información sobre los genes son importantes (incluida la regulación por aumento o por disminución de los genes) en cada uno de estos estados. La identificación de las secuencias expresadas de forma diferente en tejido de cáncer de colon, así como la expresión diferencial resultante en diferentes resultados pronósticos, permite el uso de esta información de numerosas formas.

En un ejemplo no limitante, se puede evaluar un régimen de tratamiento concreto (p. ej., para determinar su un fármaco quimioterapéutico actúa mejorando el pronóstico a largo plazo en un paciente concreto. De un modo similar, el diagnóstico se puede establecer o confirmar comparando muestras de pacientes con los perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión (o genes individuales) permiten el cribado de fármacos candidato que suprimen el perfil de expresión del cáncer de colon o convierten un perfil de mal pronóstico en un perfil de pronóstico mejor.

De acuerdo con esto, en el presente documento también se proporcionan métodos de diagnóstico de si un sujeto presenta un cáncer de colon, o esté en riesgo de desarrollarlo, que comprende la transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende sondas oligonucleotídicas específicas del miARN, para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo y comparación del perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control o patrón de referencia, en los que una alteración de la señal del al menos un miARN es indicativa de que el sujeto tiene un cáncer sólido o está en riesgo de desarrollarlo.

En una realización, la micromatriz comprende sondas oligonucleotídicas específicas de miARN para una porción considerable de todos los miARN humanos conocidos. En una realización concreta, la micromatriz comprende sondas oligonucleotídicas específicas de miARN para uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

La micromatriz se puede preparar a partir de sondas oligonucleotídicas específicas generadas a partir de secuencias de miARN conocidas. La matriz puede contener dos sondas oligonucleotídicas diferentes para cada miARN, conteniendo una la secuencia activa madura y siendo la otra específica del precursor del miARN. Asimismo, la matriz puede contener controles, tales como una o más secuencias de ratón que difieren de ortólogos humanos en sólo unas pocas bases, que puede servir como controles para hibridación en condiciones rigurosas. Los ARNt u otros ARN (p. ej., ARNr, ARNm) de ambas especies también se pueden imprimir sobre el microcircuito, lo que proporciona un control positivo interno relativamente estable para hibridación específica. En el microcircuito también se pueden incluir uno o más controles adecuados para hibridación inespecífica. Para este fin, las secuencias se seleccionan basándose en la ausencia de cualquier homología con cualquier miARN conocido.

La micromatriz se puede fabricar usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, sondas oligonucleotídicas de una longitud adecuada, por ejemplo 40 nucleótidos, son las modificadas con 5'-amina en la posición C6 y se imprimen usando sistemas de micromatriz disponibles comercialmente, por ejemplo los portaobjetos activados de GenMachine OmniGrid™ 100 Microarrayer y Amersham CodeLink™. El oligómero de ADNc marcado correspondiente a los ARN diana se prepara mediante transcripción inversa del ARN diana con un cebador marcado. Tras la síntesis de la primera hebra, los híbridos de ARN/ADN se desnaturalizan para degradar los moldes de ARN. Los ADNc diana marcados preparados de este modo hibridan después con el chip de la micromatriz en condiciones de hibridación, por ejemplo 6X SSPE/30 % de formamida a 25 °C durante 18 horas, seguido de lavado en 0,75X de TNT (Tris HCl/NaCl/Tween 20) a 37 °C durante 40 minutos. En las posiciones de la matriz en las que la sonda de ADN inmovilizada reconoce un ADNc diana complementario en la muestra se produce hibridación. El ADNc diana marcado marca la posición exacta sobre la matriz en la que se produce la unión, lo que permite la detección y cuantificación automáticas. El resultado consiste en una lista de acontecimientos de hibridación que indican la abundancia relativa de secuencias de ADNc específico y, por tanto, la abundancia relativa de los miR complementarios correspondientes, en la muestra del paciente.

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

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

Además del uso para ensayos del nivel de expresión cuantitativos de miR específicos, se puede usar un microchip que contiene sondas oligonucleotídicas específicas de miARN correspondiente a una porción considerable del miRNoma, preferentemente todo el miRNoma, para llevar a cabo el perfil de expresión del gen miR, para analizar el patrón de expresión de miR. Distintas formas de miR se pueden asociar a marcadores de enfermedad establecidos, o directamente con un estado de enfermedad.

De acuerdo con los métodos de perfil de expresión descritos en el presente documento, el ARN total de una muestra de un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon) se somete a transcripción inversa cuantitativa para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana marcados complementarios al ARN en la muestra. Después, los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan con una micromatriz que comprenden sondas oligonucleotídicas específicas de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra. El resultado es un perfil de hibridación para la muestra que representa el patrón de expresión de miARN en la muestra. El perfil de hibridación comprende la señal de una unión de los oligodesoxinucleótidos diana de la muestra a las sondas oligonucleotídicas específicas de miARN en la micromatriz. El perfil se puede registrar como la presencia o ausencia de unión (señal frente a señal cero).

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

Otras técnicas para medir la expresión del gen miR también entran dentro de la experiencia en la técnica e incluyen varias técnicas para medir los índices de transcripción y degradación del ARN.

En el presente documento también se proporcionan métodos de determinación del pronóstico de un sujeto con cáncer de colon, que comprenden medir el nivel de al menos un producto génico de miR, que está asociado a un pronóstico concreto en una enfermedad relacionada con el cáncer de colon (p. ej., un pronóstico bueno o positivo, un pronóstico malo o adverso) en una muestra de ensayo del sujeto.

De acuerdo con estos métodos, una alteración en el nivel de un producto génico de miR que está asociado a un pronóstico concreto en la muestra de ensayo, en comparación con el nivel de un correspondiente producto génico de miR en una muestra control, es indicativa de que el sujeto tienen un cáncer sólido con un pronóstico concreto. En una realización, el producto génico de miR se asocia a un pronóstico adverso (es decir, malo). Ejemplos de un pronóstico adverso incluyen, entre otros, una tasa de supervivencia baja y una rápida progresión de la enfermedad. En determinadas realizaciones, el nivel del al menos un producto génico de miR se mide mediante transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende

sondas oligonucleotídicas específicas del miARN, para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo y comparación del perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control.

5 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos de miR en las células puede tener como resultado la alteración de la regulación de una o más dianas previstas para estos miR, que puede conducir a la formación de cánceres sólidos. Por tanto, alterar el nivel del producto génico de miR (p. ej., disminuyendo el nivel de un gen miR que está regulado por aumento, en las células de cáncer sólido incrementando el nivel de un producto génico de miR que está regulado por disminución en las células de cáncer sólido) pueden tratar con éxito el cáncer sólido.

15 De acuerdo con esto, en el presente documento también se proporcionan métodos de inhibir la tumorigénesis en un sujeto que tiene un cáncer sólido, o que se sospecha que o tiene, en los que la regulación de al menos un producto génico de miR está alterada (p. ej., regulada por disminución, regulada por aumento) en las células cancerosas del sujeto. Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado por disminución en las células cancerosas (p. ej., miR-21), el método comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR aislado, o una variante o un fragmento biológicamente activo aislados del mismo, de modo que la proliferación de las células cancerosas en el sujeto está inhibida.

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

25 Como se define en el presente documento, una "variante" de un producto génico de miR hace referencia a un miARN que tiene una identidad inferior al 100% con un correspondiente producto génico de miR silvestre y posee una o más actividades biológicas del correspondiente producto génico de miR silvestre. Ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen, entre otras, la inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana (p. ej., inhibición de la traducción de una molécula de ARN diana, modulación de la estabilidad de una molécula de ARN diana, inhibición del procesamiento de una molécula de ARN diana) e inhibición de un proceso celular asociado a un cáncer sólido (p. ej., diferenciación celular, crecimiento celular, muerte celular). Estas variantes incluyen variantes de especies y variantes que son la consecuencia de una o más mutaciones (p. ej., una sustitución, una delección, una inserción) en un gen de miR. En determinadas realizaciones, la variante tiene una identidad de aproximadamente 70  
35 %, 75 %, 80 %, 85 %, 94 %, 95 %, 98 % o 99 % con un correspondiente producto génico de miR silvestre.

40 Como se define en el presente documento, un "fragmento biológicamente activo" de un producto génico de miR hace referencia a un fragmento de ARN del gen miR que posee una o más actividades biológicas de un correspondiente producto génico de miR silvestre. Como se ha descrito en lo que antecede, ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen, entre otras, la inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana y la inhibición de un proceso celular asociado a un cáncer de colon. En determinadas realizaciones, el "fragmento biológicamente activo" tiene una longitud de al menos aproximadamente 5, 7, 10, 12, 15 o 17 nucleótidos. En una realización concreta, se puede administrar a un sujeto un producto génico de miR aislado en combinación con uno o más tratamientos antitumorales adicionales. Tratamientos antitumorales adecuados incluyen, entre otros, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de los mismos (p. ej., quimiorradiación).

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

55 Se puede administrar a un sujeto un compuesto de inhibición de la expresión de un gen miR en combinación con uno o más tratamientos antitumorales adicionales. Tratamientos antitumorales adecuados incluyen, entre otros, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de los mismos (p. ej., quimiorradiación).

60 Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento", como se usan en el presente documento, se refieren a aliviar los síntomas asociados a una enfermedad o afección, por ejemplo un cáncer sólido, incluyendo prevenir o retrasar el inicio de los síntomas de la enfermedad y/o atenuar la gravedad o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad o afección. Los términos, "sujeto", "paciente" e "individuo", como se define en el presente documento, incluyen, entre otros, primates, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, roedores o murinas. En una realización preferida, el animal es un ser humano.

65 Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un producto génico de miR aislado es una

cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto que sufre un cáncer sólido. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un producto génico de miR que se ha de administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores tales como el tamaño y el peso del sujeto, la extensión de la penetración de la enfermedad, la edad, la salud y el sexo del sujeto, la vía de administración y si la administración es regional o sistémica.

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

Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado también se puede basar en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto que se va a tratar. Preferentemente, dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o enteral, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado administrada a un sujeto puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 3.000 microgramos/kg de peso corporal, de aproximadamente 700-1.000 microgramos/kg de peso corporal o mayor que aproximadamente 1.000 microgramos/kg de peso corporal.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un régimen de dosificación adecuado para la administración de un producto génico de miR aislado a un sujeto dado. Por ejemplo, un producto génico de miR se puede administrar al sujeto una vez (p. ej., en forma de una única inyección o depósito). Como alternativa, un producto génico de miR se puede administrar a un sujeto una o dos veces al día durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, más particularmente de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación concreto, un producto génico de miR se administra una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz del producto génico de miR administrada al sujeto puede comprender la cantidad total de producto génico de administrado durante todo el régimen de dosificación.

Como se usa en el presente documento, un producto génico de miR "aislado" es uno que se sintetiza o altera o elimina del estado natural mediante intervención humana. Por ejemplo, un producto génico de miR sintético, o un producto génico de miR parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural, se considera "aislado". Un producto génico de miR aislado puede existir en forma purificada sustancialmente o puede existir en una célula en la que se ha liberado el producto génico de miR. Por tanto, producto génico de miR que se libera deliberadamente en una célula, o se expresa en ella, se considera un producto génico de miR aislado. Un producto génico de miR producido dentro de una célula a partir de una molécula precursora de miR también se considera una molécula "aislada". De acuerdo con una realización concreta, los productos génicos de miR aislados descritos en el presente documento se pueden usar para la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer sólido en un sujeto (p. ej., un ser humano).

Los productos génicos de miR aislados se pueden obtener usando una serie de técnicas estándar. Por ejemplo, los productos génicos de miR se pueden sintetizar químicamente o producir de forma recombinante usando métodos conocidos en la técnica. En una realización, los productos génicos de miR se sintetizan químicamente usando fosforoamiditas ribonucleosídicas protegidas y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Los suministradores comerciales de moléculas de ARN sintéticas o reactivos de síntesis incluyen, por ejemplo, Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE.UU.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, EE.UU.), Gien Research (Sterling, VA, EE.UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE.UU.) y Cruachem (Glasgow, Reino Unido).

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

Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes se pueden aislar de sistemas de expresión de células cultivadas mediante técnicas estándar. Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes también se pueden liberar en las células cancerosas y expresarse directamente en ellas. El uso de plásmidos recombinantes para liberar los productos génicos de miR en las células cancerosas se trata con mayor detalle más adelante.

Los productos génicos de miR se pueden expresar a partir de un plásmido recombinante distinto o se pueden

expresar a partir del mismo plásmido recombinante. En una realización, los productos génicos de miR se expresan como moléculas precursoras de ARN de un único plásmido y las moléculas precursoras se procesan en el producto génico de miR funcional mediante un sistema de procesamiento adecuado, incluyendo, entre otros, sistemas de procesamiento EXTANT con una célula cancerosa. Otros sistemas de procesamiento incluyen, por ejemplo, el sistema de lisado celular *in vitro* de *Drosophila* (p. ej., como se describe en la solicitud de patente publicada de EE.UU. n° 2002/0086356 concedida a Tuschl *et al.*, la totalidad de cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia) y el sistema de ARNasa III de *E. coli* (p. ej., como se describe en la solicitud de patente publicada de EE.UU. n° 2004/0014113 concedida a Yang *et al.*).

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

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

Los productos génicos de miR también se pueden expresar en vectores virales recombinantes. Se contempla que los productos génicos de miR puedan expresarse en dos vectores virales recombinantes distintos o en el mismo vector viral. El ARN expresado en vectores virales recombinantes puede aislarse de sistemas de expresión en células cultivadas mediante técnicas estándar o se pueden expresar directamente en células cancerosas. El uso de plásmidos recombinantes para liberar los productos génicos de miR en las células cancerosas se trata con mayor detalle más adelante.

Los vectores virales recombinantes de la invención comprenden secuencias que codifican los productos génicos de miR y cualquier promotor adecuado para expresar las secuencias de ARN. Promotores adecuados incluyen, entre otros, las secuencias promotoras de ARN pol III de U6 o de H1 o los promotores del citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia en la técnica. Los vectores virales recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos de miR en una célula cancerosa.

Se puede usar cualquier vector viral capaz de aceptar las secuencias de codificación para los productos génicos de miR; por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociados (AAV); retrovirus (p. ej., lentivirus (LV), rhabdovirus, virus de la leucemia murina); virus del herpes y similares. El tropismo de los vectores virales se puede modificar mediante seudotipado de los vectores con proteínas de la cubierta u otros antígenos de superficie de otros virus o sustituyendo diferentes proteínas de la cápside viral, según sea adecuado.

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

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

Vectores virales particularmente adecuados son los derivados de AV y AAV. Un vector AV adecuado para expresar los productos génicos de miR, un método para construir el vector AV recombinante y un método para liberar el vector en células diana, se describen en Xia *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20:1006-1010.

Vectores AAV adecuados para expresar los productos génicos de miR, métodos para construir el vector AAV recombinante y métodos para liberar los vectores en las células diana, se describen en Samulski *et al.* (1987), *J. Virol.* 61:3096-3101; Fisher *et al.*, (1996), *J. Virol.*, 70:520-532; Samulski *et al.* (1989), *J. Virol.* 63:3822-3826; la patente de EE.UU. n° 5.252.479; la patente de EE.UU. n° 5.139.941; la solicitud de patente internacional n° WO 94/13788; y la solicitud de patente internacional n° WO 93/24641.

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

5 En una realización concreta, un vector viral AAV recombinante de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN precursor de miR en conexión operable con una secuencia de terminación de poli T bajo el control de un promotor de ARN U6 de humano. Como se usa en el presente documento, "en conexión operable con una secuencia de terminación poli T" significa que las secuencias de ácido nucleico que codifica las hebras sentido o antisentido están inmediatamente adyacentes a la señal de terminación polo T en dirección 5'.  
10 Durante la transcripción de las secuencias miR del vector, las señales de terminación poli T actúan finalizando la transcripción.

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

Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un compuesto que inhibe la expresión de miR es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto que sufre un cáncer (p. ej., un cáncer de colon). Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un compuesto de  
25 inhibición de la expresión de miR que se ha de administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores tales como el tamaño y el peso del sujeto, la extensión de la penetración de la enfermedad, la edad, la salud y el sexo del sujeto, la vía de administración y si la administración es regional o sistémica.

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

Un experto en la técnica también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación adecuado para la  
35 administración de un compuesto que inhibe la expresión de miR aislado a un sujeto dado.

Compuestos adecuados para inhibir la expresión del gen miR incluyen ARN bicatenario (tal como un ARN de interferencia corto o pequeño o "ARNip", ácidos nucleicos antisentido y moléculas de ARN enzimáticas, tales como  
40 ribozimas. Cada uno de estos compuestos puede estar dirigido a un producto génico de miR dado e interferir en la expresión (p. ej., inhibir la traducción, inducir la escisión o la destrucción) del producto génico de miR diana.

Por ejemplo, la expresión de un gen miR dado se puede inhibir induciendo ARN de interferencia del gen miR con una molécula de ARN bicatenario aislado ("ARNbc") que tiene al menos un 90 %, por ejemplo al menos 95 %, al  
45 menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de homología de secuencia con al menos una porción del producto génico de miR. En una realización concreta, la molécula de ARNbc es un "ARN de interferencia corto o pequeño" o "ARNip".

El ARNip útil en los presentes métodos comprenden ARN bicatenario corto de aproximadamente 17 nucleótidos a  
50 aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El ARNip comprende una hebra de ARN de hebra sentido y una hebra de ARN antisentido complementaria hibridada junto con interacciones de apareamiento de bases de Watson y Crick convencionales (en lo sucesivo en el presente documento "con apareamiento de bases"). La hebra sentido comprende una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a una secuencia de ácido nucleico contenida dentro del producto génico de miR diana.

Como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico en un ARNip que es "sustancialmente  
55 idéntica" a una secuencia diana contenida dentro del ARNm diana es una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia diana o que difiere de la secuencia diana en uno o dos nucleótidos. Las hebras sentido y antisentido del ARNip pueden comprender dos moléculas de ARN monocatenarios complementarios o pueden comprender una única molécula en la que las dos porciones complementarias están apareadas sus bases y están  
60 unidas covalentemente mediante un área "en horquilla" monocatenaria.

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

- Una o ambas hebras del ARNip pueden también comprender un saliente en 3'. Como se usa en el presente documento, un "saliente en 3'" se refiere a al menos un nucleótido desapareado que se extiende desde el extremo 3' de una hebra de ARN dúplex. Por tanto, en ciertas realizaciones, el ARNip comprende al menos un saliente en 3' de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) de longitud, de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En una realización concreta, el saliente en 3' está presente en ambas hebras del ARNip y tiene 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra del ARNip puede comprender salientes en 3' de ácido ditimidílico ("TT") o de ácido diuridílico ("uu").
- 10 El ARNip se puede producir química o biológicamente, o se puede expresar en un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito antes para los productos génicos de miR aislados. Ejemplos de métodos para producir y analizar las moléculas de ARNbc o ARNip se describen en la solicitud de patente publicada de EE.UU. nº 2002/0173478 a Gewirtz y la solicitud de patente publicada de EE.UU. nº 2004/0018176 a Reich *et al.*
- 15 La expresión de un gen miR dado también se puede inhibir mediante un ácido nucleico antisentido. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une al ARN diana por medio de interacciones de ácido nucleico ARN-ARN o ARN-ADN o ARN-péptido, que altera la actividad del ARN diana. Los ácidos nucleicos antisentido adecuados para usar en los presentes métodos son ácidos nucleicos monocatenarios (p. ej., ARN, ADN, quimeras ARN-ADN, ácido nucleico peptídico (PNA)) que generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico complementaria a una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. El ácido nucleico antisentido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es un 50-100 % complementaria, 75-100 % complementaria o 95-100 % complementaria con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR.
- 20 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los ácidos nucleicos antisentido activan la ARNasa H u otra nucleasa celular que digiere el dúplex producto génico de miR/ácido nucleico antisentido.
- Los ácidos nucleicos antisentido también pueden contener modificaciones en la estructura del ácido nucleico o en los restos de azúcar y base (o su equivalente) para potenciar la especificidad por la diana, la resistencia a la nucleasa, la liberación u otras propiedades relacionadas con la eficacia de la molécula. Dichas modificaciones incluyen restos de colesterol, intercalantes de dúplex, tales como acridina, o uno o más grupos de resistencia a nucleasa.
- 30 Los ácidos nucleicos antisentido se pueden producir química o biológicamente, o se puede expresar en un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito antes para los productos génicos de miR aislados. Ejemplos de métodos para producir y analizar están dentro de la experiencia en la técnica, véase, por ejemplo, Stein y Cheng (1993), *Science* 261:1004 y la patente de EE.UU. nº 5.849.902 a Woolf *et al.*
- 35 La expresión de un gen miR dado también se puede inhibir mediante 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 al sustrato que tiene complementariedad con una secuencia de ácido nucleico contiguo de un producto génico de miR y que es capaz de escindir específicamente el producto génico de miR. La región de unión al sustrato del ácido nucleico enzimático puede ser, por ejemplo, 50-100 % complementaria, 75-100 % complementaria o 95-100 % complementaria de una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. Los ácidos nucleicos enzimáticos también pueden comprender modificaciones en los grupos de bases, azúcar y/o fosfatos. Un ejemplo de ácido nucleico enzimático para usar en los presentes métodos es una ribozima.
- 40 Los ácidos nucleicos enzimáticos se pueden producir química o biológicamente, o se puede expresar en un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito antes para los productos génicos de miR aislados. Ejemplos de métodos para producir y analizar moléculas de ARNbc o si ARN se describen en Werner y Uhlenbeck (1995), *Nucl. Acids Res.* 23:2092-96; Hammann *et al.* (1999), *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.* 9:25-31; y la patente de EE.UU. nº 4.987.071 de Cech *et al.*
- 45 La administración de al menos un producto génico de miR, o al menos un compuesto para inhibir la expresión de miR, inhibirá la proliferación de células cancerosas en un sujeto que tiene un cáncer sólido. Como se usa en el presente documento, "inhibir la proliferación de una célula cancerosa" significa matar la célula o detener o ralentizar de forma permanente o temporal el crecimiento de la célula. La inhibición de la proliferación de células cancerosas se puede deducir si el número de dichas células en el sujeto permanece constante o disminuye tras la administración de los productos génicos de miR o de compuestos inhibidores de la expresión del gen miR. Una inhibición de la proliferación de células cancerosas también se puede deducir si el número absoluto de dichas células aumenta, pero la tasa de crecimiento tumoral disminuye.
- 50 El número de células cancerosas en el cuerpo de un sujeto se puede determinar mediante medición directa o mediante la estimación a partir del tamaño de las masas tumorales primarias o metastásicas. Por ejemplo, el número de células cancerosas en un sujeto se puede medir mediante métodos inmunohistológicos, citometría de flujo u otras técnicas diseñadas para detectar marcadores de superficie característicos de las células cancerosas.
- 55
- 60
- 65

El tamaño de una masa tumoral se puede determinar mediante observación visual directa o mediante pruebas de imagen diagnósticas, tales como rayos X, resonancia magnética, ecografía y gammagrafía. Las pruebas de imagen diagnósticas usadas para determinar el tamaño de la masa tumoral se pueden usar con o sin medios de contraste, como se conoce en la técnica. El tamaño de una masa tumoral también se puede determinar por medios físicos, tales como palpación de la masa tumoral o medición de la masa tisular con un instrumento de medida, como, por ejemplo, un compás.

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

En una realización, las células se transfectaron con un plástico o vector viral que comprende secuencias que codifican al menos un producto génico de miR o un compuesto inhibidor de la expresión del gen miR.

Los métodos de transfección para células eucariotas son bien conocidas en la técnica 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 lipófilos; liberación de ácido nucleico mediado por receptores, aceleración biobalística o de partículas; precipitación en fosfato cálcico y transfección mediada por vectores virales.

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

Un producto génico de miR o un compuesto inhibidor de la expresión del gen miR también se puede administrar a un sujeto mediante cualquier vía de administración enteral o parenteral adecuada. Las vías de administración enteral adecuadas para los presentes métodos incluyen, por ejemplo, liberación oral, rectal o intranasal. Vías de administración parenteral adecuadas incluyen, por ejemplo, administración intravascular (p. ej., inyección en bolo intravenoso, infusión intravenosa, inyección en bolo intraarterial, infusión intraarterial e instilación con catéter en la vasculatura); inyección pero e intratisular (p. ej., inyección peritumoral e inyección intratumoral, inyección intrarretiniana o inyección subretiniana); inyección o depósito subcutáneo, incluida infusión subcutánea (tal como mediante bombas osmóticas); aplicación directa en el tejido de interés, por ejemplo mediante un catéter u otro dispositivo de colocación (p. ej., una pastilla o un supositorio o un implante retiniano, que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso); e inhalación. Vías de administración particularmente adecuadas son inyección, infusión e inyección directa en el tumor.

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

En el presente documento se tratan, y/o son bien conocidos en la técnica, plásmidos recombinantes y vectores virales que comprenden secuencias que expresan los productos génicos de miR o compuestos inhibidores de la expresión del gen miR y técnicas para liberar dichos plásmidos y vectores en células cancerosas.

En una realización concreta, se usan liposomas para liberar en un sujeto un producto génico de miR o compuesto inhibidor de gen miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican). Los liposomas pueden incrementar la semivida en sangre de los productos génicos o ácidos nucleicos. Liposomas adecuados para usar en la invención se pueden formar a partir de lípidos formadores de vesículas estándar, que, en general, incluyen fosfolípidos neutros o con carga negativa y un esteroles, tal como colesterol. La selección de lípidos está guiada en general por la consideración de factores, tales como el tamaño deseado del liposoma y la semivida de los liposomas en la circulación sanguínea. Se conocen diversos métodos para preparar liposomas, tal como se describe en, por ejemplo, Szoka *et al.* (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467; y las patentes de EE.UU. nº 4.235.871. 4.501.728. 4.837.028 y 5.019.369, la totalidad de cuyas divulgaciones se incorpora en el presente documento por referencia.

Los liposomas para usar en los presentes métodos pueden comprender una molécula ligando que dirige el liposoma a las células cancerosas. Se prefieren los ligandos que se unen a receptores prevalentes en las células cancerosas, como los anticuerpos monoclonales que se unen a los antígenos de células tumorales.

Los liposomas para usar en los presentes métodos también se pueden modificar de modo que se evite su

eliminación por el sistema de macrófagos mononucleares ("SMM") y el sistema reticuloendotelial ("RES"). Dichos liposomas modificados tienen restos de inhibición de la opsonización sobre la superficie o incorporarlos en la estructura del liposoma. En una realización particularmente preferida, un liposoma de la invención puede comprender tanto restos de opsonización-inhibición como un ligando.

5 Los restos de inhibición de la opsonización para usar en la preparación de los liposomas de la invención son, habitualmente, polímeros hidrófilos grandes que están unidos a la membrana del liposoma. Como se usa en el presente documento, un resto de inhibición de la opsonización está "unido" a la membrana de un liposoma cuando está química o físicamente unido a la membrana, por ejemplo mediante intercalado de un ancla soluble en lípidos en la propia membrana o mediante unión directa a grupos activos de los lípidos de la membrana. Estos polímeros hidrófilos de inhibición de la opsonización forman una capa de superficie protectora que disminuye significativamente la captación de los liposomas por el SMM y el RES, por ejemplo como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.920.016.

15 Los restos de inhibición de la opsonización adecuados para modificar los liposomas son, preferentemente, polímeros hidrosolubles con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 500 a 40.000 dalton y, más preferentemente, de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 dalton. Dichos polímeros incluyen derivados de polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG), por ejemplo metoxi PEG o PPG, y estearato de PEG o PPG; polímeros sintéticos, tales como poliacrilamida o poli-N-vinilpirrolidona; poliamidoaminas lineales, ramificadas o dendrímicas; ácidos poliacrílicos; polialcoholes, por ejemplo alcohol polivinílico y polixilitol a los que los grupos carboxílico o amino está químicamente unidos, así como gangliósidos, tal como el gangliósido GM1. Los copolímeros de PEG, metoxi PEG o metoxi PPG o derivados de los mismos también son adecuados. Además, el polímero de inhibición de la opsonización puede ser un copolímero de bloque de PEG y un ácido poliamino, polisacárido, poliamidoamina, polietilenamina o polinucleótido. Los polímeros de inhibición de la opsonización también pueden ser polisacáridos naturales que contienen aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péctico, ácido neuramínico, ácido algínico, carragenina; polisacáridos u oligosacáridos aminados (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por ejemplo que han reaccionado con derivados de ácidos carbónicos con la unión resultante de grupos carboxílicos. Preferentemente, el resto de inhibición de la opsonización es un PEG, PPG o derivados de los mismos. En ocasiones, los liposomas modificados con PEG o derivados de PEG se denominan "liposomas PEGilados".

El resto de inhibición de la opsonización puede estar unido a la membrana del liposoma mediante una cualquiera de las numerosas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida de PEG se puede unir a un ancla liposoluble de fosfatidiletanolamina y, después, se puede unir a una membrana. De forma similar, un polímero de dextrano se puede derivar con un ancla liposoluble de estearilamina mediante aminación reductora usando  $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$  y una mezcla de disolventes, tal como tetrahidrofuran y agua en una proporción de 30:12 a 60 °C.

Los liposomas modificados con restos de inhibición de la opsonización permanecen en la circulación mucho más tiempo que los liposomas no modificados. Por este motivo, dichos liposomas se denominan, en ocasiones, liposomas "encubiertos". Se sabe que los liposomas encubiertos se acumulan en los tejidos alimentados por microvasculatura porosa o "con fugas". Por tanto, el tejido caracterizado por dichos defectos de la microvasculatura, por ejemplo los tumores sólidos, acumulan de forma eficiente estos liposomas; véase Gabizon *et al.* (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18:6949-53. Además, la captación reducida por el RES disminuye la toxicidad de los liposomas encubiertos impidiendo la acumulación significativa de los liposomas en el hígado y el bazo. Por tanto, los liposomas que se modifican con restos de inhibición de la opsonización sin particularmente adecuados para liberar los productos génicos de miR o compuestos inhibidores de la expresión del gen miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) en las células tumorales.

Los productos génicos de miR o compuestos inhibidores de la expresión de miR se pueden formular como composiciones farmacéuticas, en ocasiones denominadas "medicamentos", antes de administrarlas a un sujeto de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia. De acuerdo con esto, la invención abarca composiciones farmacéuticas para tratar un cáncer sólido. En una realización, la composición farmacéutica comprende al menos un producto génico de miR aislado, una variante o fragmento biológicamente activo aislados del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización concreta, el al menos un producto génico de miR corresponde a un producto génico de miR que tiene un menor nivel de expresión en las células de cáncer sólido respecto a las células control adecuadas. En ciertas realizaciones, el producto génico de miR aislado se selecciona del grupo que consiste en miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

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

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

Las presentes composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) (p. ej., den 0,1 a 90 % en peso) o una sal fisiológicamente aceptable de los mismos, mezclados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden adicionalmente uno o más agentes anticancerosos (p. ej., agentes quimioterapéuticos). Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden también comprender al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) que están encapsuladas por liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende un gen miR o producto génico de miR que es miR-21.

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

En una realización concreta, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también comprender al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) que es resistente a la degradación por nucleasas. Un experto en la técnica puede sintetizar fácilmente ácidos nucleicos que son resistentes a nucleasa, incorporando, por ejemplo, uno o más ribonucleótidos que están modificados en la posición 2' en el producto génico de miR. Ribonucleótidos que están modificados en la posición 2' incluyen los modificados en la posición 2' con flúor, amino, alquilo, alcoxi y O-alilo.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizantes, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, tampones y agentes de ajuste del pH. Aditivos adecuados incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente biocompatibles (p. ej., trometamina clorhidrato), adiciones de quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o bisamida-DTPA) o complejos de quelato cálcico (tal como, por ejemplo, DTPA cálcico, CaNaDTPA-bisamida) u, opcionalmente, adiciones de sales de calcio o de sodio (p. ej., cloruro cálcico, ascorbato cálcico, gluconato cálcico o lactato cálcico). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden envasarse para usar en forma líquida o pueden estar liofilizadas.

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

Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida para administración oral puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes indicados anteriormente y 10-95 %, preferentemente 25 %-75 %, del al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican). Una composición farmacéutica para administración en aerosol (inhalación) puede comprender de 0,01-20 % en peso, preferentemente 1%-10 % en peso, del al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) encapsulados en un liposoma como se ha descrito anteriormente y un propulsor. También se puede incluir un vehículo según se desee, por ejemplo lecitina para liberación intranasal.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender adicionalmente uno o más agentes antitumorales. En una realización concreta, las composiciones comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) y al menos un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que son adecuados para los métodos de la invención incluyen, entre otros, agentes alquilantes de ADN, agentes antibióticos antitumorales, agentes antimetabólicos, agentes estabilizantes de la tubulina, agentes desestabilizantes de la tubulina, agentes antagonistas de hormonas, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la proteína quinasa, inhibidores de la HMG-CoA, inhibidores de CDK, inhibidores de ciclina, inhibidores de caspasa, inhibidores de metaloproteinasas, ácidos nucleicos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ácidos nucleicos y agentes ecotóxicos, virales y bacterianos modificados a nivel molecular. Ejemplos de agentes adecuados para las composiciones de la presente invención incluyen, entre otros, citidina arabinósido, metotrexato, vincristina etopósido (VP-16), doxorubicina (adriamicina), cisplatino (CDDP), dexametasona, arglabina, ciclofosfamida, sarcolisina, metilnitrosourea, fluorouracilo, 5-fluorouracilo (5FU), vinblastina, camptotecina, actinomicina D, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, oxaliplatino, irinotecán, topotecán, leucovorina, carmustina, estreptoizocina, CPT-11, taxol, tamoxifeno, dacarbazina, rituximab, daunorubicina, 1-β-D-arabinofuranosilcitosina, imatinib, fludarabina, docetaxel, FOLFOX4.

En el presente documento también se proporcionan métodos de identificación de un inhibidor de la tumorigénesis, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de

miR en la célula. En una realización, el método comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado a los menores niveles de expresión en las células de cáncer. Se proporciona un incremento del nivel del producto génico de miR en la célula después del agente, con respecto a una célula control adecuada (p. ej., no se proporciona el agente) es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de la tumorigénesis. En una realización concreta, al menos un producto génico de miR asociado a una disminución de los niveles de expresión en las células de cáncer se selecciona del grupo constituido por miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, el método comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado a los mayores niveles de expresión en las células de cáncer, Se proporciona un disminución del nivel del producto génico de miR en la célula después del agente, con respecto a una célula control adecuada (p. ej., no se proporciona el agente) es indicativo de que el agente de ensayo es un inhibidor de la tumorigénesis. En una realización concreta, al menos un producto génico de miR asociado a un aumento de los niveles de expresión en las células de cáncer se selecciona del grupo constituido por miR20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203 y combinaciones de los mismos.

Agentes adecuados incluyen, entre otros, fármacos (p. ej., moléculas pequeñas, péptidos) y macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos). El agente se puede producir de forma recombinante, sintética, o se puede aislar (es decir, purificar) a partir de una fuente natural. Varios métodos para proporcionar dichos agentes a una célula (p. ej., transfección) son bien conocidos en la técnica y diversos de dichos métodos se han descrito anteriormente en el presente documento. Asimismo, en la técnica se conocen los métodos para detectar la expresión de al menos un producto génico de miR (p. ej., transferencia Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR, perfil de la expresión). Varios de estos métodos también se han descrito en el presente documento en lo que antecede.

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

### Ejemplo 1

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

Se compararon los perfiles de microARN de 84 pares de tejidos tumorales de colon y no tumorales adyacentes usando micromatrices de microARN<sup>30</sup>. Estos 84 sujetos eran pacientes reclutados del área mayor de Baltimore, Maryland, con una incidencia del adenocarcinoma de colon y se denomina cohorte de ensayo de Maryland (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de la población y tumores

	Cohorte de ensayo de Maryland	Cohorte de validación de Hong Kong
	N= 84	N= 113
Área de reclutamiento	Baltimore, Maryland, EE.UU.	Hong Kong, China
Edad en el momento de la inclusión, años	64,6 ± 10,7	55,8 ± 15
Media ± DT		
Intervalo	32-87	32-84
Sexo, n° (%)		
Masculino	66 (79)	56 (50)
Femenino	18 (21)	57 (50)
Raza, N° (%)		
Blanca	52 (62)	0 (0)
Negra	32 (38)	0 (0)
Asiáticos	0 (0)	113 (100)
Localización del tumor, n° (%)		
Distal	48 (59)	90 (30)
Proximal	34 (41)	2 (20)
Histología del adenocarcinoma, n° (%)		
Adenocarcinoma	75 (89)	105 (93)
Adenocarcinoma mucinoso	8 (10)	7 (6)
Carcinoma adenoescamoso	1 (1)	0 (0)
Célula en anillo de sello y mucinosa	0 (0)	1 (1)
Quimioterapia adyuvante <sup>2</sup> - n° (%)		
Recibida	22 (37)	4 (35)
No recibida	37 (63)	73 (65)

Estadio TNM (%)		
II	29 (34)	37 (33)
III	36 (43)	48 (42)
IV	10 (12)	19 (17)

<sup>1</sup>Distal incluye tumores localizados dentro o distales del colon descendente. Los tumores proximales incluyen tumores dentro de o proximales al ángulo esplénico. Se conocía la localización del tumor de 82 sujetos en la cohorte original y de todos los sujetos de la cohorte de validación.

<sup>2</sup>Se conocía Información detallada perteneciente a la recepción de la quimioterapia par 59 sujetos en la cohorte de ensayo y para todos los sujetos en la cohorte de validación. La quimioterapia estaba basada, principalmente, en fluorouracilo (en forma de 5-fluorouracilo intravenoso o fármacos orales, incluyendo tegafur con uracilo [UFT]) con o sin Levamisol o Leucovorina

Los perfiles de microARN de los tumores eran claramente diferentes de los perfiles no tumorales. Se encontró que treinta y siete microARN independientes se expresaban de forma diferente en los tumores ((p < 0,001 con una falsa tasa de descubrimiento < 0,5 %; **Tabla 2**.

5

**Tabla 2 – MicroARN que se expresan de forma diferencial en los tumores**

Sonda	miR maduro	Valor p <sup>1</sup>	TDF <sup>2</sup>	Nº de cambios	Localización en el cromosoma
hsa-mir-21Nol	miR-21	< 1 E-07	< 1 E-07	1,7	17q23,2
hsa-mir-021-prec-17Nol	miR-21	< 1 E-07	< 1 E-07	1,8	17q23,2
hsa-mir-092-prec-13=092-1No2	miR-92	< 1 E-07	< 1 E-07	1,4	13q31,3
hsa-mir-222-precNo2	miR-222	1,40 E-06	9,05 E-05	1,2	Xp11,3
hsa-mir-181b-2No1	miR-181b	1,90 E-06	8,74 E-05	1,2	9q33,3
hsa-mir-210-prec	miR-210	1,12 E-05	0,00032	1,2	11p15,5
hsa-mir-020-prec	miR-20a	2,53 E-05	0,00057	1,5	13q31,3
hsa-mir-106-prec-X	miR-106a	3,30 E-05	0,00058	1,4	X26,2
hsa-mir-106aNol	miR-106a	3,51 E-05	0,00058	1,4	X26,2
hsa-mir-093-prec-7,1=093-1	miR-93	3,52 E-05	0,00058	1,2	7q22,1
nsa-mir-335No2	miR-335	3,55 E-05	0,00058	1,2	7q32,2.
hsa-mir-222-precNol	miR-222	4,27 E-05	0,00065	1,2	Xp11,3
hsa-mir-338Nol	miR-338	5,78 E-05	0,00074	1,1	17q25,3
hsa-mir-133bNo2	miR-133b	6,50 E-05	0,00079	1,1	6p12,2
hsa-mir-092-prec-X=092-2	miR-92	7,95 E-05	0,00083	1,4	Xq26,2
hsa-mir-346Nol	miR-346	8,42 E-05	0,00084	1,2	10q23,2
hsa-mir-106bNol	miR-106b	0,0002091	0,00178	1,2	7q22,1
hsa-mir-135-2-prec	miR-153a	0,0002363	0,00194	1,1	12q23,1
hsa-mir-219-INo2	miR-219	0,0002515	0,00199	1,3	9q34,11
hsa-mir-34aNol	miR-34a	0,000265	0,00203	1,1	1p36,22
hsa-mir-099b-prec-19NO1	1miR-99b	0,0003758	0,00259	1,1	19q13,41
hsa-mir-185-preeNO2	miR-185	0,0003827	0,00259	1,2	22q11,21
hsa-mir-223-prec	miR-223	0,0004038	0,00265	1,4	Xq12
hsa-mir-211-preoNo2	miR-211	0,0004338	0,00277	1,1	15q13,3
hsa-mir-135-1-prec	miR-135a	0,0004648	0,00287	1,1	3p21,1
hsa-mir-127-prec	miR-127	0,0004748	0,00287	1,1	14q32,31
hsa-mir-203-precNol	miR-203	0,0004993	0,00294	1,4	14q3233
hsa-mir-212-precNol	miR-212	0,0006339	0,00364	1,1	17p13,3
hsa-mir-095-prec-4	miR-95	0,0006996	0,00392	1,2	4p16,1
hsa-mir-017-precNo2	miR-17-5p	0,0007252	0,00392	1,3	13q31,3
MicroARN con expresión reducida en tumores					
Sonda	miR maduro	Valor p <sup>1</sup>	TDF <sup>2</sup>	Nº de cambios	Localización en el cromosoma
hsa-mir-342No2	miR-342	4,00 E-06	0,00015	0,9	14q32,2
hsa-mir-192-2/3Nol	miR-192	8,74 E-06	0,00029	0,7	11q13,1
hsa-mir-1-2No2	miR-1	2,22 E-05	0,00057	0,9	18g11,2
hsa-mir-34bNo2	miR-34b	4,78 E-05	0,00069	0,8	11q23,1
hsa-mir-215-precNol	miR-215	5,26 E-05	0,00071	0,7	1q41
hsa-mir-192Nol	miR-192	7,36 E-05	0,00081	0,7	11q13,1
hsa-mir-301 No2	miR-301	7,44 E-05	0,00081	0,7	17q23,2

hsa-miR-324-SpNo2	miR-324-5p	1,00E-04	0,00096	0,9	17p13,1
hsa-mir-030a-precNo2	miR-30a-3p	0,0001933	0,00171	0,9	6q13
hsa-mir-1-1 No2	miR-1	0,0002906	0,00216	0,9	20q13,33
hsa-mir-34cNo2	miR-34c	0,0007334	0,00392	0,9	11q23,1
hsa-mir-331 No2	miR-331	0,0008555	0,00446	0,9	12q22
hsa-mir-148bNo2	miR-148b	0,0008726	0,00446	0,9	12q13,13

<sup>1</sup>Los valores P indicados son el resultado de un análisis de comparación de clase pareado de los patrones de expresión de microARN de 84 pares de adenocarcinomas de colon y tejido no tumoral.  
<sup>2</sup>TDF = Tasa de descubrimientos falsos

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

Los inventores eligieron miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b and miR-203 para la validación a base de sus diferencias de expresión entre tejidos tumoral y no tumoral pareado combinado con su asociación a una supervivencia mala. Para la validación, los inventores midieron los niveles de expresión de estos microARN con RT-PCRc en tejido tumoral y no tumoral pareado de una cohorte independiente. La cohorte de validación consiste en 113 pacientes reclutados de Hong Kong, China con cáncer de colon incidente (Tabla 1).

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

**Tabla 3 – Expresión de microARN en tumores frente a tejido no tumoral pareado**

Tabla 3a-Cohorte de validación de Hong Kong				
microARN	$\Delta\Delta Ct^1$	DT ( $\Delta\Delta Ct$ )	Nº de cambios tumores <sup>2</sup>	Valor $p^3$
miR-20a	1,18	0,97	2,3 veces	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
miR-21	1,47	1,20	2,8 veces	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
miR-106a	1,25	0,94	2,4 veces	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
miR-181 b	0,47	1,03	1,4 veces	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
miR-203	0,83	1,40	1,8 veces	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>

**Tabla 3 b– Expresión de microARN en adenoma frente a tejido no adenoma pareado**

microR	Promedio $\Delta\Delta Ct^1$	DT( $\Delta\Delta Ct$ )	Nº de cambios adenomas <sup>2</sup>	Valor $p^3$
miR-20a	-0,11	0,97	0,9 veces	$p = 0,82$
miR-21	0,64	0,90	1,6 veces	<b><math>p = 0,006</math></b>
miR-106a	0,28	1,22	1,2 veces	$p = 0,19$
miR-181b	0,30	1,24	1,2 veces	$p = 0,27$
miR-203	0,77	1,98	1,7 veces	$p = 0,14$

<sup>1</sup>Promedio ( $\Delta Ct$  del tumor –  $\Delta Ct$  no tumoral pareado) o promedio ( $\Delta Ct$  de adenoma –  $\Delta Ct$  de no adenoma pareado) de RT-PCRc.

<sup>2</sup>Calculado mediante  $2^{\Delta\Delta}$

<sup>3</sup>Prueba de Wilcoxon de pares igualados. DT = Desviación estándar. Los números en negrita son estadísticamente significativos. Para las comparaciones tumor/no tumor se usaron 113 pares para miR-20a and miR-203, mientras que se usaron 111 pares de tejido para miR-21, miR-106a y miR-181b Para todas las comparaciones de adenoma/no adenoma se usaron 18 pares de tejido.

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

Los inventores usaron hibridación *in situ* para visualizar la expresión de miR-21 en tejido tumoral y no tumoral adyacente (véase las Figuras 1a-f).

MiR-21 se expresa a niveles altos en los núcleos y el citoplasma de células epiteliales colónicas en tejido tumoral humano en comparación con el tejido no tumoral adyacente. Estos resultados son compatibles como la RT-PCRc y los datos de micromatriz y avalan la existencia de un papel de los microARN en la carcinogénesis.

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

Los adenomas representan un estadio precursor de los adenocarcinomas de colon<sup>3</sup>. Los inventores analizaron los niveles de expresión de miR-20a, miR21, miR-106a, miR-181b y miR-203 mediante RT-PCRc en 18 pares de adenoma y tejido no adenoma adyacente. Aunque cuatro de cinco microARN mostraron mayores niveles en el tejido de adenoma, solo miR-21 estaba significativamente enriquecido 1,6 veces más ( $p = 0,006$ , prueba de Wilcoxon de pares igualados) (véase la **Tabla 3b**).

El tejido de adenoma expresó niveles más altos de miR-21 en 15/18 pares igualados. Los estadios más avanzados de tumores expresan niveles más altos de miR-21. Los sujetos se estratificaron basándose en el diagnóstico de adenoma y la estadificación TNM, en los que el adenoma se consideró en más avanzado y el estadio IV de TNM el más avanzado. Los adenomas expresaron niveles más bajos de expresión de miR-21 que los tumores de la cohorte de validación ( $p < 0,001$ , prueba de Mann-Whitney). Los tumores más avanzados expresaron niveles más altos de expresión de miR-21 (prueba de la tendencia,  $p < 0,001$ ) (véase la Figura 1g).

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

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

Los inventores analizaron las proporciones individuales de expresión de micro ARN en tumores/no tumores (T/N) para determinar si alguna estaba asociada a un mal pronóstico. Las proporciones de expresión de microARN T/N se clasificaron como altas basándose en su tercil más alto. Los inventores investigaron cualquier microARN en el que proporciones elevadas de T/N estaban asociadas a la supervivencia del cáncer ( $p < 0,05$ ). A partir de estos, se seleccionaron microARN expresados de forma diferencial en los tumores ( $p < 0,001$ ). Cinco microARN satisficieron estos criterios. El análisis de Kaplan-Meier indicó que proporciones elevadas de T/N para miR-20a ( $p = 0,02$ ), miR-21 ( $p = 0,004$ ), miR-106a ( $p = 0,01$ ), miR-181b ( $p = 0,04$ ) y miR-203 ( $p = 0,004$ ) estaban cada una asociadas a una mala supervivencia. Estos cinco microARN se seleccionaron para su análisis posterior.

Los adenocarcinomas del 89-93 % de los sujetos en este estudio tenían una histología típica. Una minoría de los tumores tenían histologías de adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso o carcinoma de Célula en anillo de sello (véase la Tabla 1). Diferentes subtipos de adenocarcinomas se pueden asociar a diferentes desenlaces, incluido el pronóstico de la supervivencia<sup>31</sup>. Para eliminar la potencial confusión asociada a la histología, los inventores excluyeron a todos los sujetos con adenocarcinomas mucinosos, carcinomas adenoescamosos y carcinomas de células en anillo de sello del análisis inicial.

Las asociaciones de las proporciones T/N a una supervivencia mala podrían deberse a niveles de expresión de microARN en el tejido tumoral y el tejido no tumoral adyacente o una combinación de ambos. Para distinguir estas posibilidades, los inventores analizaron la asociación de la expresión de microARN en tumores y no tumores pareados por separado. Los niveles de expresión alta en tumores (en el tercil más alto) para miR-20a, miR-21, miR106a, miR-181b y miR-203 estaban asociados a una mala supervivencia en la cohorte de ensayo de Maryland (véase la Figura 3a, también de datos no mostrados). No se observó ninguna asociación significativa a expresión de microARN en tejido no tumoral para cualquiera de los cinco microARN.

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

**Tabla 4** - Análisis de riesgos proporcionales de Cox univariados y multivariados de los niveles de expresión de miR-21 y la supervivencia global del cáncer en sujetos con adenocarcinoma de colon<sup>1</sup>

Tabla 4a	Cohorte de ensayo de Maryland			
	Análisis univariable		Análisis multivariable <sup>2</sup>	
Característica	HR (IC del 95 %)	Valor p	HR (IC del 95 %)	Valor p
Expresión de miR-21 <sup>3</sup> N=71				
Baja	1,0		1,0	
Alta	<b>2,5 (1,2 - 5,2)</b>	<b>0,01</b>	<b>2,9 (1,4-6,1)</b>	<b>0,004</b>
Estadio TNM				
I-II	1,0		1,0	
III-IV	<b>3,5 (1,6 - 7,9)</b>	<b>0,002</b>	<b>3,4 (1,5-7,8)</b>	<b>0,004</b>
Edad en el momento de la inclusión				
<50	1,0			
≥50	0,7 (0,2 - 2,3)	0,52		
Sexo				
Femenino	1,0			
Masculino	1,4 (0,5 - 3,9)	0,57		

Raza				
Blanca	1,0			
Negra	1,0 (0,5 - 2,1)	0,97		
Localización del tumor				
Distal	1,0			
Proximal	0,6(0,3 - 1,4)	0,26		
<b>Tabla 4b</b>	Cohorte de validación de Hong Kong			
	Análisis univariable		Análisis multivariable <sup>2</sup>	
Característica	HR (IC del 95 %)	Valor p	HR (IC del 95 %)	Valor p
Expresión de miR-21 <sup>3</sup>				
n=103				
Baja	1,0		1,0	
Alta	<b>2,4 (L4 - 3,9)</b>	<b>0,002</b>	<b>2,4 (1,4-4,1)</b>	<b>0,002</b>
Estadio TNM				
I-II	1,0		1,0	
III-IV	<b>4,7 (2,4 - 9,5)</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>4,7 (2,4-9,5)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Edad en el momento de la inclusión	1,0			
< 50				
≥50	1,5 (0,9 - 2,6)	0,14		
Sexo				
Femenino	1,0			
Masculino	1,4 (0,8 - 2,3)	0,29		
Localización del tumor				
Distal	1,0			
Proximal	0,7 (0,3 - 1,4)	0,27		
<p>La expresión de microARN se midió con micromatrices de miARN para la cohorte de Maryland y con RT-PCRc con la cohorte de Hong Kong. <sup>1</sup> Los casos con adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso o carcinomas de células en anillo de sello se excluyeron de este análisis.</p> <p><sup>2</sup>El análisis multivariable usó adición y eliminación escalonada de las covariables clínicas que se había encontrado que estaban asociadas a la supervivencia en modelos univariados (p &lt; 0,10) y los modelos finales solo incluyen las covariables asociadas significativamente a la supervivencia (estadística de Wald p &lt; 0,05).</p> <p><sup>3</sup>La expresión alta en los tumores para todos los miARN se definió basándose en el tercil más alto.</p>				

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

5 Para validar estos hallazgos, los inventores usaron una RT-PCRc para medir los niveles de expresión tumoral y no tumoral para estos cinco microARN en la cohorte de validación de Hong Kong y se analizaron las asociaciones con el pronóstico. Una expresión tumoral alta de miR-21 predice un mal pronóstico en la cohorte de validación de Hong Kong (p = 0,001, prueba del orden logarítmico de Kaplan-Meier) mientras que la expresión en tejido no tumoral no lo hace (véase la Figura 3b).

Los inventores no encontraron asociaciones estadísticamente significativas con el pronóstico y la expresión de miR-20a, miR-106a, 181b o miR-203 en esta cohorte,

15 La expresión elevada de miR-21 en tumores no se asoció significativamente con la edad, el sexo, la histología del tumor o la localización del tumor (prueba exacta de Fisher) en la cohorte de validación de Hong Kong. Todas las covariables se analizaron mediante análisis de riesgos proporcionales de Cox (**Tabla 4b**).

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

25 Los inventores repitieron el análisis incluyendo a todos los sujetos con independencia de la histología del tumor. En ambas cohortes, la asociación a una expresión alta de miR-21 y el pronóstico permaneció (véase la Figura 5, véase la **Tabla 5**).

**Tabla 5** - Análisis de riesgos proporcionales de Cox univariables y multivariables de los niveles de expresión de miR-21 y la supervivencia global del cáncer en sujetos con todos los sujetos

<b>Tabla 5a</b>				
Cohorte de ensayo de Maryland				
Característica	Análisis univariable		Análisis multivariable	
	HR (IC del 95 %)	Valor p	HR (IC del 95 %)	Valor p
Expresión de miR-21				
N = 79				
Baja	1,0		1,0	
Alta	<b>2,0 (1,1 - 4,0)</b>	<b>0,04</b>	<b>2,1 (1,1-4,0)</b>	<b>0,03</b>
Estadio TNM				
I-II	1,0		1,0	
III-IV	<b>3,2 (1,5 - 6,9)</b>	<b>0,002</b>	<b>3,2 (1,5-6,8)</b>	<b>0,003</b>
Edad en el momento de la inclusión				
< 50	1,0			
≥ 50	0,7 (0,2 - 2,4)	0,59		
Sexo				
Femenino	1,0			
Masculino	1,6 (0,7 - 4,2)	0,33		
Raza				
Blanca	1,0			
Negra	1,0 (0,5 - 2,0)	0,99		
Localización del tumor				
Distal	1,0			
Proximal	0,8(0,3 - 2,1)	0,65		
Histología del adenocarcinoma	1,0			
Mucinoso o Adenoescamoso	0,7 (0,3 - 2,1)	0,57		
<b>Tabla 5b</b>				
Cohorte de validación de Hong Kong				
Característica	Análisis univariable		Análisis multivariable <sup>2</sup>	
	HR (IC del 95 %)	Valor p	HR (IC del 95 %)	Valor p
Expresión de miR-21 <sup>3</sup> n = 111				
Baja	1,0		1,0	
Alta	<b>2,3 (1,4 - 3,9)</b>	<b>0,002</b>	<b>2,3 (1,4-3,9)</b>	<b>0,002</b>
Estadio TNM				
I-II	1,0		1,0	
III-IV	<b>4,9 (2,5 - 97)</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>4,9 (2,5-98)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Edad en el momento de la inclusión				
< 50	1,0			
≥ 50	1,4 (0,8 - 2,4)	0,20		
Sexo				
Femenino	1,0			
Masculino	1,3 (0,8 - 2,3)	0,27		
Localización del tumor				
Distal	1,0			
Proximal	0,7 (0,3 - 1,4)	0,27		
Histología del adenocarcinoma	1,0			
Mucinoso o Adenoescamoso	1,2 (0,4 - 3,3)	0,74		
La expresión de microARN se midió con micromatrices de miARN para la cohorte de Maryland y con RT-PCRc con las cohortes de Hong Kong.				
1Todos los individuos se incluyeron en este análisis con independencia de la histología del tumor. El análisis multivariable usó adición y eliminación escalonada de las covariables clínicas que se había encontrado que estaban asociadas a la supervivencia en modelos univariables (p < 0,10) y los modelos finales solo incluyen las covariables asociadas significativamente a la supervivencia (estadística de Wald p < 0,05). <sup>3</sup> La expresión alta en los tumores para todos los miARN se definió basándose en el tercil más alto.				

### Niveles de expresión de miR-21 y respuesta al tratamiento

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

En ambas cohortes, los regímenes quimioterapéuticos estaban basadas, principalmente, en fluorouracilo (en formas de 5-fluorouracilo intravenoso o fármacos orales, incluyendo tegafur con uracilo [UFT]) con o sin Levamisol o Leucovorina. Solo los sujetos con histología típica de adenocarcinoma se usaron para este análisis, dejando 20 de 42 individuos en estadio II/III que recibieron quimioterapia en la cohorte de Maryland. Para aquéllos que recibieron quimioterapia, una expresión alta de miR-21 en tumores predijo una supervivencia global peor ( $p = 0,01$ , prueba del orden logarítmico de Kaplan-Meier) dando soporte preliminar de que una expresión alta de miR-21 está asociada a una peor respuesta a la quimioterapia adyuvante.

Para la cohorte de validación de Hong Kong, para este análisis se usaron 77 individuos con cáncer en estadio II/III con histología típica de adenocarcinoma. Los sujetos en estadio II/III que recibieron quimioterapia adyuvante tenían un pronóstico de supervivencia mejor que los que no la recibieron ( $p = 0,02$ , prueba del orden logarítmico de Kaplan-Meier). Entre estos sujetos que recibieron quimioterapia ( $n=36$ ), una expresión alta de miR-21 en tumores se asoció con una respuesta peor al tratamiento ( $p = 0,03$ , prueba del orden logarítmico de Kaplan-Meier) coherente con las observaciones en la cohorte de Maryland (véase la Figura 5a).

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

El análisis multivariable de regresión de Cox se usó para analizar estas observaciones para mostrar que una expresión alta de miR-2 predijo un pronóstico malo ( $HR = 3,1$  [1,5 - 6,1];  $p = 0,001$ ) y haber recibido quimioterapia era predictivo de mejores desenlaces de supervivencia ( $HR = 0,3$  [0,1 - 0,5];  $p < 0,001$ ) con independencia de otras covariables clínicas (Tabla 6a).

**Tabla 6** - Análisis de riesgos proporcionales de Cox univariables y multivariables de los niveles de expresión de miR-21, haber recibido quimioterapia adyuvante y la supervivencia del cáncer en sujetos en estadio I/III<sup>1</sup> con adenocarcinoma

Tabla 6a	Cohorte de ensayo de Maryland			
	Análisis univariable		Análisis multivariable <sup>2</sup>	
Característica	HR (IC del 95 %)	Valor p	HR (IC del 95 %)	p-
Expresión de miR-21 <sup>3</sup>				
N=77				
Baja	1,0		1,0	
Alta	<b>2,6 (1,3 - 5,1)</b>	<b>0,005</b>	<b>3,1 (1,5 - 6,1)</b>	<b>0,001</b>
No recibió quimioterapia adyuvante	1,0		1,0	
Recibida	<b>04. (0,2 - 0,8)</b>	<b>0,01</b>	<b>0,3 (0,1 - 0,5)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Estadio TNM				
II	1,0		1,0	
III	<b>2,8(1,3 - 6,0)</b>	<b>0,008</b>	<b>5,4 (2,4 - 12)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Localización del tumor			1,0	
Distal	1,0			
Proximal	<b>0,3(0,1 - 1,0)</b>	<b>0,04</b>	<b>0,2 (0,1 - 0,8)</b>	<b>0,02</b>
Edad en el momento de la inclusión				
< 50	1,0			
≥50	1,6 (0,8 - 3,1)	0,20		
Sexo				
Femenino	1,0			
Masculino	1,2 (0,6 - 2,3)	0,61		
<b>Tabla 6b</b>	Cohorte de validación de Hong Kong			
	Análisis univariable		Análisis multivariable <sup>2</sup>	

Característica	HR (IC del 95 %)	Valor p	HR (IC del 95 %)	Valor p
Expresión de miR-21 <sup>3</sup>				
N=119				
Baja	1,0		1,0	
Alta	<b>2,6 (1,5 - 4,5)</b>	<b>0,001</b>	<b>3,0 (1,7 - 5,4)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
No recibió quimioterapia adyuvante	1,0		1,0	
Recibida	<b>0,7 (0,4 - 1,2)</b>	<b>0,21</b>	<b>0,4 (0,2 - 0,8)</b>	<b>0,004</b>
Estadio TNM				
	1,0		1,0	
III	<b>3,2 (1,7 - 6,1)</b>	<b>0,001</b>	<b>5,2 (2,6 - 11)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Localización del tumor			1,0	
Distal	1,0			
Proximal	<b>0,4(0,2 - 0,8)</b>	<b>0,02</b>	<b>0,3 (0,1 - 0,7)</b>	<b>0,007</b>
Edad en el momento de la inclusión				
< 50	1,0			
≥50	1,4 (0,7 - 2,5)	0,32		
Sexo				
Femenino	1,0			
Masculino	1,3 (0,7 - 2,2)	0,44		

La expresión de miARN se midió con RT-PCRc. <sup>1</sup>TLos sujetos en estadio TNM II/III con adenocarcinoma de histología típica se incluyeron en este análisis. <sup>2</sup>El análisis multivariable usó adición y eliminación escalonada de las covariables clínicas que se había encontrado que estaban asociadas a la supervivencia en modelos univariados ( $p < 0,10$ ) y los modelos finales solo incluyen las covariables asociadas significativamente a la supervivencia (estadística de Wald  $p < 0,05$ ). <sup>3</sup>La expresión alta en los tumores para todos los miARN se definió basándose en el tercil más alto. La raza no se asoció con un mal pronóstico.

El análisis con la recaída del cáncer como criterio de valoración en lugar de la muerte por cáncer tuvo como resultado asociaciones similares con una expresión alta de miR-21 en tumores, lo que predice una recurrencia de la enfermedad más rápida (datos no mostrados),

Un análisis con ambas cohortes combinadas tuvo como resultado asociaciones similares. El análisis de Kaplan-Meier demostró que la expresión alta de miR-21 predijo un mal pronóstico en sujetos en estadio II ( $p = 0,02$ ) o estadio III ( $p = 0,004$ ) (véase la Figura 6).

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

## ANÁLISIS

Los inventores analizaron perfiles de microARN en tejidos de cáncer de colon usando dos cohortes independientes. Treinta y siete microARN se expresaron de forma diferencial en tejidos tumorales mediante análisis en micromatriz de microARN. Los patrones de expresión de los cinco microARN analizados se validaron en la cohorte de Hong Kong. La potencia discriminadora de cinco microARN para diferenciar entre tejido tumoral y no tumoral indica que se producen cambios predecibles y sistemáticos de los patrones de expresión de microARN durante la tumorigénesis y probablemente sean representativos de la mayoría de los adenocarcinomas de colon esporádicos.

Se descubrió que todos los MiR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b y miR-203 se expresaban a niveles más altos en tumores de colon. Estos cambios en los patrones de expresión de microARN se pueden asociar simplemente a cáncer de colon o ser causales de la progresión histológica a cáncer. Existen fuertes indicios que sugieren que los cambios en los patrones de expresión de microARN estimulan la formación de tumores, especialmente para miR-20a y miR-21. MiR-20a forma parte del grupo de microARN policistrónico miR-17-92 <sup>32</sup>.

La sobreexpresión de este grupo potencia la proliferación celular *in vitro*<sup>33</sup> y acelera la formación de tumores en modelos animales<sup>16</sup>. La expresión reforzada del grupo miR-17-92 produce un aumento del tamaño del tumor y vascularización tumoral en ratones al regular negativamente la proteína antiangiogénica Tspl <sup>24</sup>. Los signos experimentales también sugieren que el aumento de la expresión de miR-21 estimula el desarrollo de tumores. MiR-21 se expresa a niveles altos en la mayoría de los tumores sólidos <sup>19,34</sup>. La sobreexpresión de miR-21 actúa como

factor antiapoptótico en células de glioblastoma humano<sup>13</sup>. La inhibición de miR-21 inhibe el crecimiento celular *in vitro* e inhibe el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto en ratón mediante una regulación por disminución indirecta del factor antiapoptótico Bcl-2<sup>35</sup>. En los estudios en líneas celulares humanas se ha demostrado que miR-21 también se puede dirigir a los genes supresores tumorales PTEN<sup>36</sup> y TP53<sup>37</sup>. Todos estos datos en conjunto avalan la existencia de un papel causal de la expresión alterada de microARN durante la tumorigénesis.

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

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

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

La expresión alta de miR-21 en tumores estaba asociada a una mala respuesta a la quimioterapia adyuvante en ambas cohortes. Estos resultados pueden ayudar a predecir los beneficios del tratamiento en individuos cuyo estado de expresión de miR-21 se conoce. Además, si la expresión alta de miR-21 tiene una relación causal con la supervivencia mala de los pacientes de cáncer de colon, los antagonistas<sup>29,39</sup> u otras terapéuticas antisentido dirigidas a miR-21 pueden tener beneficios terapéuticos en los sujetos con tumores de expresión alta de miR-21. Estos se pueden usar además de los tratamientos actuales para mejorar los desenlaces de supervivencia.

Los inventores en el presente documento han hallado diferencias sistemáticas en los patrones de expresión de microARN entre tumores de colon y tejido no tumoral pareado. La expresión alta de miR-21 en tumores predice un desenlace de supervivencia malo y mala respuesta a la quimioterapia adyuvante en dos cohortes independientes, con independencia de la estadificación y otras covariables clínicas, lo que sugiere que puede ser un biomarcador diagnóstico útil para los adenocarcinomas de colon y el pronóstico de supervivencia, incluida la respuesta al tratamiento.

## **MÉTODOS**

### **Recolección de muestras y aislamiento de ARN**

Pres de tumor de colon primario y tejido no tumoral adyacente se obtuvieron de 84 pacientes reclutados del Centro Médico de la Universidad de Maryland entre 1993 y 2002, y de 113 pacientes reclutados del Queen Mary Hospital de Hong Kong entre 1991 y 2000. Se han obtenido informaciones detalladas de cada donante de tejido, incluyendo edad, sexo, estadificación clínica, localización del tumor, tiempos de supervivencia desde el diagnóstico y recepción de quimioterapia adyuvante. La histopatología del tumor se clasificó acorde a la clasificación de sistemas tumorales de la Organización Mundial de la Salud<sup>1</sup>. El tejido de adenoma se obtuvo de la Red Cooperativo de Tejidos Humanos. Este estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de los Institutos Nacionales de Salud, la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Hong Kong/Hospital Authority Hong Kong West Cluster y la Junta de Revisión Institucional para Investigación con sujetos humanos en la Universidad de Maryland.

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

El ARN se extrajo del tejido usando métodos estándar TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad). El perfil de la micromatriz del microARN se realizó como se ha descrito anteriormente<sup>30</sup>. En resumen, 5  $\mu$ g del ARN total se marcó e hibridó con cada micromatriz de microARN que contenía cuadruplicados de aproximadamente 400 sondas para microARN humanas. Los portaobjetos se analizaron usando un analizador PerkinElmer ScanArray LX5K, se realizó RT-PCR de los microARN usando ensayos Taqman MicroARN (Applied Biosystems, Foster City) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el sistema de RT-PCR 7500 en tiempo real (Applied Biosystems, Foster City). U6B fue el control de la normalización para todos los experimentos de RT-PCR. Todos los ensayos se realizaron por duplicado (miR-20a, miR-203) o por triplicado (miR-21, miR-106a, miR-181b). La RT-PCR. Para miR-21, miR-106a and miR-181b se realizó con AJS, enmascarado para los desenlaces de supervivencia y los datos clínicos para los miembros de la cohorte de validación en ese momento.

**Análisis en micromatriz:**

Los datos tratados en esta publicación se han depositado en el Gene Expression Omnibus de os NCBI (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y son accesibles a través de la serie GEO con número de acceso GSE7828. Los datos de micromatrices normalizados por LOESS se importaron a las herramientas de matriz de BRB 3,5,0 (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) y todos los posteriores análisis de micromatriz se realizaron con este software.

Se realizaron análisis en micromatriz. Las sondas con pérdida de valores > 20 % de las matrices se eliminaron del análisis, dejando 230 sondas. Los análisis de comparación de clase pareados identificaron microARN expresados de forma diferencial en los tumores ( $p < 0,001$ ).

Para buscar inicialmente microARN asociados a una supervivencia mala, las proporciones de expresión de microARN en tumor/no tumor (T/N) se analizaron en la cohorte de Maryland usando datos de micromatriz. Las proporciones de expresión de TN para microARN se crearon restando el  $\log_2$  de los valores de expresión en tejido no tumoral del  $\log_2$  de los valores de expresión en tumores. Los microARN con pérdidas >25 % de proporciones de T/N se eliminaron dejando 208. Las proporciones de expresión en T/N se dicotomizaron con el tercil más alto clasificado como alta y los 2 terciles más bajos clasificados como baja (véase Métodos complementarios). El valor de corte alto/bajo se usó universalmente a lo largo de este estudio. Los niveles de expresión de microARN en tumor y en tejido no tumoral se normalizaron por lotes basándose en la fecha de los experimentos en micromatrices para todos los análisis de asociaciones con la supervivencia.

**Hibridación *in situ*:**

La hibridación *In situ* (HIS) se realizó con sondas para miR-21 humano, mixto y U6 (Exiqon, Woburn) con una versión modificada del protocolo del fabricante para tejido incluido en parafina fijado con formalina (FFPE) redactado por Kloosterman ([http://www.exiqon.com/uploads/LNA\\_52-FFPE\\_miRNA\\_in\\_situ\\_protocol.pdf](http://www.exiqon.com/uploads/LNA_52-FFPE_miRNA_in_situ_protocol.pdf)) en tejido de colon humano. Entre las modificaciones incluyeron el uso de anticuerpo policlonal de conejo anti-DIG/conjugado con HTP y el sistema DakoCytomation GenPoint Tyramide Signal Amplication System (DakoCytomation, Carpintería) y el sustrato VECTOR® NovaRed™ (Vector Laboratories, Burlingame). Las imágenes se tomaron en un microscopio Olympus BX40 usando la cámara digital Olympus DP70 y el software de control (Olympus, Champaign).

**Análisis estadístico:**

Se realizaron análisis estadísticos. Se usaron pruebas de pares igualados de Wilcoxon para analizar diferencias en la expresión de microARN entre tumores y tejido no tumoral pareado, así como diferencias entre adenoma y tejido no adenomatoso pareado para todos los datos de RT-PCRc. Todas las pruebas de tendencia indicadas son pruebas no paramétricas para la tendencia a través de grupos ordenados. Todos los análisis de Kaplan-Meier se realizaron con WINSTAT 2001 (R. Fitch Software). EL análisis de regresión de Cox multivariable se realizó usando Intercooled Stata 9,2 (StataCorp LP, College Station). Los modelos multivariados finales se basaron en la adición escalonada y se ha hallado que la eliminación de las covariables clínicas estaba asociada a una mala supervivencia en modelos univariados ( $p < 0,10$ ). Se usó una estadística de Wald de  $p < 0,05$  como criterios para la inclusión en los modelos multivariados finales. Todos los valores  $p$  indicados fueron bilaterales. Los cocientes de riesgos instantáneos se indican con los intervalos de confianza del 95% entre paréntesis. Los gráficos de expresión se realizaron usando Graphpad Prism 4,0 (Graphpad Software Inc., San Diego).

**Análisis adicionales con micromatrices**

Las micromatrices usadas para este análisis eran micromatrices de microARN *pin-spotted* (del Ohio State University Comprehensive Cancer Center, versión 2,0). Las intensidades de cada punto eran la mediana de las intensidades de primer plano. Cada una de las 170 micromatrices usadas para este estudio contenía 11.520 puntos. Todos los puntos en los que la intensidad de primer plano era inferior a la de fondo se reasignaron como NA (NA marca los puntos con falta de datos). Todos los puntos marcados como deficientes por el analizador también se volvieron a asignar como NA. Todos los puntos en blanco (sin oligo) con una intensidad de primer plano alta volvieron a asignar como NA. Cada oligo para microARN se representa mediante puntos cuadruplicados en estas matrices como dos pares distantes de dos puntos adyacentes. Si había 0 o 1 NA para un oligo cuádruple y la media de los pares oligo distantes diferían en > 1 sobre la escala de  $\log_2$ , todos los puntos por cuadruplicado se reasignaron como NA. Si había 2 o 1 NA para un oligo cuádruple y las dos intensidades de punto no NA diferían en > 1 sobre la escala de  $\log_2$ , todos los puntos por cuadruplicado se reasignaron como NA. Si había 3 puntos NA para un cuádruple, el punto final se reasignó como NA. En total, 1.082.689 de 1.958.400 puntos se reasignaron como NA usando estos métodos. La normalización LOESS (Locally Weighted Scatterplot Smoothing) se realizó usando el paquete de software R. Todos los datos se importaron después en la versión de las herramientas de matrices BRB 3,5,0 para análisis y se realizó la media de todos los puntos duplicados. Inicialmente había 85 pares (tumor y tejido no tumoral pareado) de matrices usadas. Un caso identificado inicialmente como un paciente de carcinoma de colon incidente se encontró más tarde que se había diagnosticado como carcinoma *in situ* y se eliminó del análisis, dejando la población de estudio con 84 sujetos. Las listas de microARN se filtraron para incluir únicamente a los 389 conjuntos de sondas

hsa-miR humanas. Se filtraron adicionalmente para eliminar todos los conjuntos de sondas que carecían de más del 25% de las matrices, dejando 230 conjuntos de sondas de microARN humanas. Se usó análisis de comparación de clase pareados para identificar microARN expresados de forma diferencial entre los tumores y los tejidos no tumorales pareados. Para dos microARN (miR-181b y miR-338), dos sondas independientes de medición dio cada

5 una resultados contradictorios, mostrando una sonda una expresión más alta en tumores y una sonda una expresión más baja en tumores por cada microARN. Para cada una se desechó el resultado menos significativo, que designó tanto a miR-181b como a miR-338 como enriquecidos en tumores. Adicionalmente, la RT-PCR confirmó que miR-181b estaba enriquecido en los tumores.

10 Inicialmente, los inventores usaron perfiles de expresión en tumores/no tumores (T/N) para cada microARN para buscar microARN asociados a una supervivencia mala. Para este análisis, los inventores decidieron dicotomizar todos los datos de expresión con un valor de corte alto y bajo universal para buscar asociaciones con una supervivencia mala. Para determinar qué valor de corte alto / bajo universal usar, los inventores dicotomizaron los

15 datos de expresión en T/N de tres formas distintas y determinaron qué método daba el mayor número de resultados significativos en la cohorte de ensayo. La expresión alto se clasificó basándose en un valor más alto que la mediana, el tercil más alto o el cuartil más alto y los inventores analizaron las asociaciones con estos valores de corte con una supervivencia mala usando análisis de regresión de Cox univariable. De los 37 microARN que se expresaron de forma diferencial en los tumores, la expresión alta de cuatro se asociaron a una supervivencia mala basándose en un valor más alto que la mediana, cinco basándose en el tercil más alto y dos basándose en el cuartil más alto ( $p < 0,05$ , datos no mostrados). La dicotomización basada en el tercil más alto dio que la mayoría de los microARN

20 estaban asociados a una supervivencia mala basándose en estos criterios en la cohorte de ensayo de Maryland; por tanto, la clasificación basada en el tercil más alto se usó de forma uniforme a lo largo de este estudio para analizar las asociaciones entre los niveles de expresión de microARN y un mal pronóstico en la cohorte de ensayo de Maryland y la cohorte de validación de Hong Kong.

25 Los inventores usaron micromatrices de microARN para comparar los niveles de expresión de miR-21 en tumores con un pronóstico. La sonda de micromatriz usada para este análisis fue hsa-miR-21-prec17Nol. Este análisis requirió la normalización por lotes de los datos basada en la fecha del experimento de micromatriz. Para normalizar por fecha, las matrices que expresan el 1/3 más alto de un microARN dado se clasificaron como altas para cada día, por separado. Se realizó el perfil de hasta doce pares de tejido un día dado. Para cualquier día en el que se realizaron

30 menos de 10 pares de micromatrices, las matrices realizadas dichos días se desecharon, lo que tuvo como resultado la pérdida de 5 pares de matrices. Después, estos datos se combinaron juntos para el análisis de las asociaciones con desenlaces de supervivencia. Los inventores comprobaron y no hallaron diferencias significativas en la distribución por frecuencia de la edad, el sexo, la raza, la localización del tumor, el estadio TNM o la supervivencia del cáncer entre grupos clasificada basándose en la fecha del experimento de la micromatriz (prueba exacta de Fisher).

### **Análisis estadísticos**

40 Se usó regresión de riesgos proporcionales de Cox para analizar el efecto de los niveles de expresión de miR-21 y otra variable clínica sobre la supervivencia del paciente. Las variables clínicas incluidas fueron la edad, el sexo, la raza, la localización del tumor, la histología del tumor, la recepción de terapia adyuvante y la estadificación TNM. Para estos modelos, los inventores eligieron dicotomizar la edad como edad  $> 50$  años frente a edad  $< 50$  dado que la edad de selección recomendada para el cáncer de colon es la de 50; la localización del tumor se definió como

45 proximal si el tumor estaba localizado dentro o cerca del ángulo esplénico y distal si el tumor estaba localizado dentro o lejos del colon descendente; la estadificación TNM se dicotomizó a base de enfermedad metastásica frente a no metastásica, lo que tiene como resultado estadio I-II frente a III-IV. Un paciente en la cohorte de Maryland murió el día de la cirugía, lo que dio como resultado un tiempo de supervivencia de 0 meses. Este caso se incluyó en el análisis de Kaplan-Meier y se eliminó del análisis de regresión de Cox, dando la diferencia en los casos entre la

50 expresión de miR-21 en los tumores para la Figure 2 ( $n = 72$ ) y el número de casos en el análisis de regresión de Cox de la Tabla 4 ( $n = 71$ ). La regresión de Cox univariable se realizó con cada covariable clínica para analizar la influencia de cada una sobre la supervivencia del paciente. Los modelos multivariados finales se basaron en la adición escalonada y se ha hallado que la eliminación de las covariables clínicas estaba asociada a una mala supervivencia en modelos univariados ( $p < 0,10$ ). Se usó una estadística de Wald de  $p < 0,05$  como criterios para la

55 inclusión en los modelos multivariados finales. Se usó una estadística de Wald de  $p < 0,05$  como criterios para la inclusión en los modelos multivariados finales. EL modelo de regresión de Cox más parsimonioso se usó para el modelo multivariable final.

### **Ejemplo 2. RESULTADOS INICIALES**

#### **60 Los MiARN se expresan de forma diferencial en los tumores de colon**

Los inventores analizaron los perfiles de microARN de 85 pares de tejidos de colon cancerosos y no cancerosos adyacentes usando micromatrices de microARN. Los inventores encontraron que los perfiles de expresión de miARN de los tumores eran bastante diferentes de los de los tejidos normales, lo que sugiere que los miARN pueden desempeñar papeles significativos en la carcinogénesis de colon. Los análisis de comparación de clase pareados

65

identificaron 27 miARN independientes expresados de forma diferencial en estos tumores (**Tabla 7**).

**Tabla 7** - 27 miARN se expresaron de forma diferencial en tumores de colon en comparación con tejido normal pareado. Usando análisis de comparaciones de clase pareados en herramientas de matrices BRN se encontró que 27 miARN se expresaban de forma diferencial en tumores. Se usó un valor de significación de  $p < 0,001$  como criterios para la expresión diferencial, que tuvo como resultado una tasa de descubrimientos falsos estimada de 0,08 %. Aumento se refiere a miARN expresados a niveles más altos en tumores, mientras que disminución indica que los niveles de miARN eran menores en los tumores.

Tabla 7	microARN	Regulado por aumento/disminución	Valor p
1	miR-331	Disminución	1,00 E-07
2	miR-21	Aumento	1,00 E-07
3	miR-34b	Disminución	2,00 E-07
4	miR-342	Disminución	2,00 E-07
5	miR-215	Disminución	2,20 E-05
6	miR-371	Disminución	7,00 E-07
7	miR-373	Disminución	6,30 E-06
8	miR-192	Disminución	7,70 E-06
9	miR-148b	Disminución	1,03 E-05
10	miR-138	Disminución	1,49 E-05
11	miR-301	Disminución	1,85 E-05
12	miR-338	Disminución	2,63 E-05
13	miR-153	Disminución	2,67 E-05
14	miR-129	Disminución	3,20 E-05
15	miR-222	Aumento	9,08 E-05
16	miR-346	Aumento	0,000126
17	miR-204	Aumento	0,000244
18	miR-181 b	Aumento	0,000263
19	let-7a-2	Disminución	0,000272
20	miR-106a	Aumento	0,000305
21	miR-093	Aumento	0,000334
22	miR-34c	Disminución	0,003441
23	miR-219	Aumento	0,000352
24	miR-019b	Aumento	0,000364
25	miR-210	Aumento	0,000389
26	miR-185	Aumento	0,000516
27	miR-1	Disminución	0,00064

10 La tasa de falsos descubrimientos, para constituir las pruebas de múltiples comparaciones, fue de aproximadamente un 0,8%, lo que indica que la mayoría, si no todos estos miARN, se expresan de forma diferencial y no es el resultado de las pruebas de múltiples comparaciones. Se descubrió que once miARN tenían niveles de expresión elevados en tumores, mientras que se descubrió que 16 miARN estaban reducidos en los tumores. Adicionalmente, se podían usar perfiles de miARN para predecir si el tejido era o no tumoral o no tumoral con una precisión del 92%.

15 Basándose en 2.000 permutaciones aleatorias, la probabilidad que estas predicciones se produzcan al azar era extremadamente baja ( $p < 0,0005$ ). Estos resultados muestran que hay diferencias sistemáticas en los perfiles de expresión de miARN entre los tumores y el tejido normal, lo que indica que los perfiles de expresión de miARN se alteran durante la carcinogénesis de colon.

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

Los inventores determinaron si los perfiles de expresión de miARN predicen la supervivencia de los pacientes. Para este análisis, los inventores calcularon las proporciones de expresión de miARN en tumor frente a tejido normal (proporciones T/N) para cada miARN para cada individuo. El agrupamiento jerárquico sin supervisión de todas las proporciones T/N de miARN agrupó a los individuos en dos grupos marcados de forma arbitraria en grupo A y grupo B (Figura 7).

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

30 Esto indicó que los perfiles de miARN globales eran predictivos de la estadificación clínica y, de forma más importante, del pronóstico de la supervivencia.

El análisis de regresión de Cox univariable y multivariable se usó para cuestionar esta relación con más detalle

(Tabla 8).

**Tabla 8 Análisis de regresión de Cox de los perfiles globales de miARN**

Los análisis de regresión de Cox univariados (anteriormente) y multivariados (más adelante) se realizaron para mostrar que los individuos clasificados en el grupo B de miARN tenían un riesgo mayor de morir por cáncer de colon, Ni la edad, ni el sexo ni la raza fueron contribuyentes significativos del riesgo de supervivencia. Para los fines de estos análisis, la edad se dicotomizó en mayor o menor de 50 años y la raza se dicotomizó en afroamericanos (AA) y caucásicos.

Análisis univariable		
Variable	HR (IC del 95 %)	Valor p
Grupo B/A	2,6 (1,0 - 6,3)	0,042
edad ≥50/edad < 50	0,62 (0,14 - -2,7)	0,53
Varón/mujer	1,4 (0,48 - 4,0)	0,54
AA/Caucásico	1,1 (0,83 - 2,3)	0,83
Grupo B/A	2,7 (1,1 - 6,8)	0,034
edad ≥50/edad < 50	0,49 (0,11 - -2,2)	0,35
Varón/mujer	1,5 (0,52 - 4,4)	0,45
AA/Caucásico	1,0 (0,45 - 2,2)	0,99

Los individuos del grupo B tenían un riesgo significativamente mayor de morir por cáncer de colon (cociente de riesgos instantáneos [HR] = 2,6 (p = 0,04). El riesgo permaneció significativamente alto después de ajustar por edad, etnicidad y sexo (HR = 2,7; p = 0,03). Estos resultados demuestran el potencial de usar perfiles de miARN de tumores de colon para predecir el pronóstico. Estos resultados sugieren que los miARN también pueden desempeñar un papel en la carcinogénesis del colon.

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

Los inventores identificaron miARN cuyos niveles de expresión eran predictivos del pronóstico del cáncer de colon, Los inventores usaron gráficos de supervivencia de Kaplan Meier y análisis de regresión de Cox multivariable con las proporciones de T/N para identificar los patrones de expresión de miARN que se asociaban a un pronóstico de mala supervivencia. Se usaron las herramientas de matrices BRB para identificar las proporciones de T/N correlacionadas con una supervivencia mala (datos no mostrados), Los inventores escogieron analizar estos miARN con mayor detalle. Los inventores también analizaron cualquier miARN expresado de forma diferencial en los tumores (p < 0,01). Las proporciones de T/N para cada individuo se dicotomizaron basándose en la mediana o al cuartil más alto de las proporciones de T/N Los inventores también eliminaron cualquier miARN de estos análisis en el que faltaban proporciones T/N en más de 18 individuos. Los inventores identificaron al menos 9 miARN, incluyendo miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-16h, miR-203, let-7tg, miR-29a, miR-103-2 y miR-10a cuyas proporciones T/N predicen el pronóstico del cáncer de colon (Figura 8, **Tabla 9**).

**Análisis de regresión de Cox de las proporciones T/N para miARN individuales**

Los análisis de regresión de Cox univariados y multivariados se realizaron para mostrar que las proporciones T/N de miARN individuales se podían usar para clasificar a los individuos en riesgo mayor de morir por cáncer de colon. Las proporciones T/N para estos 9 de miARN eran predictores significativos del pronóstico de supervivencia independientes de la estadificación TNM, la edad, el sexo y la raza. Obsérvese que las distinciones alta/baja para miR-16b, miR-21, miR-29a, miR-103-2, miR- 106a y miR-203 se clasificaron basándose en la mediana de los valores de la proporción T/N mientras que let-7g, miR-10a and miR-1815 se clasificaron basándose en las proporciones T/N del cuartil más alto.

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

Variable	HR (IC del 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
Alta/baja de miR-21	3,0 (11,3 - 7,0)	0,01	80
Análisis multivariable			
Alta/baja de miR-21	2,8 (1,2 - 6,8)	0,02	
edad ≥50/edad < 50	0,46 (0,10 - 2,1)	0,32	
Varón/mujer	3,1(0,9-11,0)	0,07	
AA/Caucásico	1,2 (0,5 - 2,7)	0,66	
Estadio III-IV/Estadio I-III	4,4 (1,6 - 11,9)	0,004	
Análisis univariable			

ES 2 562 607 T3

Alta/baja de miR-181b	3,4(1,6 - 7,5)	0,002	78
Análisis multivariable			
Alta/baja de miR-181b	3,3 (1,3 - 8,2)	0,01	
edad ≥50/edad < 50	0,39 (0,08 - 1,8)	0,23	
Varón/mujer	2,2 (0,7 - 7,2)	0,17	
AA/Caucásico	1,1 (0,5 - 2,5)	0,82	
Estadio III-IV/Estadio I-III	3,1 (1,2 - 8,1)	0,02	
Análisis univariable			
Alta/baja de let-7g	2,7(1,3 - 5,9)	0,01	84
Análisis multivariable			
Alta/baja de let-7q	2,5 (1,1 - 5,5)	0,03	
edad ≥50/edad < 50	0,5 (0,1 - 2,4)	0,39	
Varón/mujer	1,5 (0,5 - 4,4)	0,50	
AA/Caucásico	1,3 (0,6 - 2,9)	0,50	
Estadio III-IV/Estadio I-II	3,6 (1,4 - 9,2)	0,006.	
Variable	HR (IC del 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
Alta/baja de miR-103-2	2,5 (1,1 - 5,6)	0,03	81
Análisis multivariable			
Alta/baja de miR-103-2	3,1 (1,3 - 7,5)	0,01	
edad ≥50/edad < 50	0,5 (0,1 - 2,2)	0,36	
Varón/mujer	1,6 (0,6 - 4,9)	0,38	
AA/Caucásico	0,8 (0,4 - 1,9)	0,69	
Estadio III-IV/Estadio I-III	4,4 (1,7 - 11,1)	0,002	
Variable	HR (IC del 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
Alta/baja de miR-16b	4,6(1,7 - 12,5)	0,003	69
Análisis multivariable			
Alta/baja de miR-16b	5,1 (1,8 - 15,9)	0,003	
edad ≥50/edad < 50	0,4 (0,08 - 1,7)	0,20	
Varón/mujer	3,2 (0,8 - 1,7)	0,12	
AA/Caucásico	0,9 (1,9 - 22,4)	0,003	
Estadio III-IV/ Estadio / Estadio I-III	6,5 (1,9 - 22,4)	0,003	
Variable	HR (IC del 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
Alta/baja de miR-106a	2,6 (1,1 - 6,1)	0,01	82
Análisis multivariable			
Alta/baja de miR-106a	2,4 (1,0 - 5,7)	0,05	
edad ≥50/edad < 50	0,54 (0,11 - -2,5)	0,44	
Varón/mujer	1,8 (0,5 - 6,5)	0,34	
AA/Caucásico	1,1 (0,5 - 2,5)	0,84	
Estadio III-IV/Estadio I-III	5,4 (1,8 - 16,0)	0,002	
Variable	HR (IC del 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
Alta/baja de miR-203	3,8 (1,4 - 10,5)	0,01	57
Análisis multivariable			
Alta/baja de miR-203	3,2 (1,1 - 9,4)	0,03	
edad ≥50/edad < 50	1,0 (0,1 - -8,1)	0,97	
Varón/mujer	1,4 (0,4 - 5,1)	0,61	
AA/Caucásico	0,9 (0,4 - 2,3)	0,83	
Estadio III-IV/Estadio I-III	3,9 (1,3 - 11,8)	0,02	

Variable	HR (IC del 95 %)	p =	n
Análisis univariable			
Alta/baja de miR-29a	3,1 (1,3 - 7,3)	0,01	77
Análisis multivariable			
Alta/baja de miR-29a	3,2 (1,3 - 7,9)	0,01	
edad ≥50/edad < 50	0,5 (0,1 - -2,2)	0,35	
Varón/mujer	2,2 (0,6 - 7,4)	0,22	
AA/Caucásico	0,9 (0,4 - 2,1)	0,76	
Estadio III-IV/Estadio I-U	4,5 (1,7 - 12,2)	0,003	
Análisis univariable			
Alta/baja de miR-10a	2,7 (1,3 - 5,7)	0,01	84
Análisis multivariable			
Alta/baja de miR-10a	3,5 ( 1,5 - 7,8)	0,003	
edad ≥50/edad < 50	0,4 (0,1 - -1,9)	0,26	
Varón/mujer	1,7 (0,6 - 5,0)	0,34	
AA/Caucásico	1,0 (0,45 - 2,3)	0,98	
Estadio III-IV/Estadio I-III	4,9 (1,9 - 12,2)	0,001	

La expresión de miR-21 está elevada en los tumores (Tabla 7). Las proporciones T/N de miR-21 también están asociadas también a la estadificación clínica y el pronóstico de supervivencia para los pacientes de cáncer de colon (Tabla 9, Figura 8a).

5 Había una tendencia de que los individuos con estadificación TNM más avanzada tienen proporciones T/N más altas ( $p = 0,034$ ). Las proporciones de T/N se dicotomizaron basándose en la mediana de los valores para cada uno de los 80 individuos con datos. Los individuos con proporciones de expresión T/N de miR-21 altas tenían un pronóstico de la supervivencia peor basándose en el análisis de Kaplan Meier ( $p = 0,004$ ), lo que sugiere que los tumores que expresan niveles altos de miR-21 predicen un mal pronóstico. Estos resultados se analizaron adicionalmente con análisis de regresión de Cox.

10 Los individuos con proporciones de T/N altas de miR-21 estaban en riesgo más alto con análisis tanto univariable (HR = 3,0;  $p = 0,01$ ) como multivariable (HR = 2,8;  $p = 0,02$ ) ajustando por edad, sexo, raza y estadificación TNM (Tabla 9).

20 Este resultado ha sugerido que los niveles de expresión de miR-21 pueden ser útiles como métodos de predicción de pronóstico y puede proporcionar un valor más predictivo del pronóstico de la supervivencia que la estadificación TNM sola. Se ha descubierto que miR-21 se expresa de forma diferencial en muchos tipos de tumores<sup>12-18</sup>

En los estudios también se demostró que niveles altos de miR-21 puede conducir a una inhibición de la apoptosis en células de glioblastoma<sup>5</sup> mientras que la inhibición de miR-21 puede conducir a un incremento de la proliferación en células HeLa<sup>19</sup>.

25 Los inventores en el presente documento descubrieron que miR-21 ahora se cree que contribuye a la carcinogénesis de colon de un modo similar.

Los inventores han hallado que las proporciones T/N de miR-106a elevadas en los tumores (Tabla 7) y de miR-106a están asociadas al pronóstico de la supervivencia (Tabla 9, Figura 8b).

30 MiR-106a es un miembro de una clase de miARN parálogos que incluyen miR-17, miR-20, miR-106a, y miR-106h<sup>20</sup>. Estos miARN son muy similares entre sí en cuanto a que difieren en únicamente 1-2 nucleótidos. Debido a su similitud, es probable que todos ellos tengan dianas similares. De forma interesante, los cuatro de estos miARN muestran patrones de expresión similares y asociaciones con el pronóstico (datos no mostrados). En el presente documento, los inventores han presentado asociaciones para miR-106a, pero no descartan formalmente la posibilidad de cualquiera o todos de los demás parálogos de miARN contribuyen a esta asociación. Las proporciones de T/N de MiR-106a se dicotomizaron basándose en la mediana de los valores para cada uno de los 82 individuos con datos. Los individuos con proporciones T/N de expresión de miR-106a altas tenían un pronóstico de la supervivencia peor basándose en el análisis de Kaplan Meier ( $p = 0,013$ ; Figura 8b).

40 Esto sugiere que los tumores que expresan niveles altos de miR-106a son predictivos de un mal pronóstico de supervivencia. Los individuos con proporciones de T/N altas de miR-106a estaban en riesgo más alto con análisis tanto univariable (HR = 2,6;  $p = 0,01$ ) como multivariable (HR = 2,4;  $p = 0,05$ ) ajustando por edad, sexo, raza y estadificación TNM (Tabla 7). Por tanto, miR-106a puede ser un predictor pronóstico útil del pronóstico de cáncer de

colon independiente de la estadificación TNM. De forma interesante, se ha demostrado que el gen supresor de tumor retinoblastoma, es una diana funcional de miR-106a<sup>12</sup>, lo que soporta un mecanismo de cómo miR-106a puede contribuir mecánicamente a la carcinogénesis del colon.

- 5 La sobreexpresión del grupo miR-17-92, que contiene parálogos de miR-106a, tuvo como resultado un desarrollo acelerado del tumor en ratones<sup>10</sup>. Esto muestra, experimentalmente, que los miARN de la familia de miR-106a son capaces de afectar a la carcinogénesis, o que refuerza además la hipótesis de que miR-106a puede contribuir a la carcinogénesis y a la progresión del tumor.
- 10 Los patrones de expresión de siete miARN adicionales se asociaron a la estadificación clínica y un mal pronóstico de supervivencia (Tabla 9, Figuras 8c-8i).

15 Existe una tendencia de que los individuos con un diagnóstico de estadificación TNM más avanzado tenían proporciones T/N más altas para let-7a (p = 0,010), miR-10a (p = 0,008), miR-16h (p = 0,048), miR-29a (p = 0,005), miR-103-2 (p = 0,033), miR-181h (p = 0,016) y miR-203 (p = 0,016) (Figura 8).

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

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

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

35 Los inventores usaron las proporciones T/N para los 9 miARN mencionados anteriormente para desarrollar una firma de miARN que se pueda usar para predecir el pronóstico del cáncer de colon, Los individuos que carecen de más de 2 de 9 de estos valores se excluyeron de este análisis. El agrupamiento jerárquico de las proporciones T/N de los 9 miARN tuvo como resultado agrupamiento de los 78 pacientes restantes en dos grupos (Figura 9a).

40 Estos grupos tenían pronósticos de supervivencia significativamente diferentes (Figura 9b; p = 0,004). Los análisis de regresión de Cox univariantes (HR = 3,2, p = 0,008) y multivariantes (HR = 2,8; p = 0,04) demostraron que la firma de miARN estaba asociada a un mal pronóstico de supervivencia independiente de la estadificación TNM (Tabla 10).

**Tabla 10** Análisis de regresión de Cox de la firma de microARN

Análisis univariable		
Variable	HR (IC del 95 %)	Valor p
Grupo B/A de 9 miR	3,2 (1,4 - 7,8)	0,008
Multivariable ajustando por edad, sexo y raza		
Variable	HR (IC del 95 %)	Valor p
Grupo B/A de 9 miR	2,8 (1,0 - 7,4)	0,043
edad ≥50/edad < 50	0,4 (0,08 - 1,8)	0,23
Varón/mujer	1,9 (0,6 - 6,6)	0,29
AA/Caucásico	0,9 (1,4 - 10,7)	0,82
Estadio III-IV/Estadio I-III	3,9 (1,4 - 10,7)	0,007

45 Los análisis de regresión de Cox univariantes (anteriormente) y multivariantes (ajustando por edad, sexo, raza y estadificación más adelante), se realizaron para mostrar que los individuos clasificados en el grupo B usando la 9 firma de miARN tenían un riesgo mayor de morir por cáncer de colon, Ni la edad, ni el sexo ni la raza contribuyeron significativamente al riesgo de supervivencia. Este riesgo asociado a la asignación de grupo es independiente de la estadificación.

50 Estos resultados demuestran que las formas de miARN se pueden usar como biomarcadores para predecir el pronóstico de la supervivencia de los pacientes con cáncer de colon,

## Discusión

Los miARN individuales se expresan de forma diferencial en tumores de colon<sup>12,13</sup> lo que sugiere que una expresión alterada de estos miARN puede formar parte de los cambios celulares responsables de la carcinogénesis del colon.

5 Además de estos hallazgos, los inventores han mostrado en el presente documento que los perfiles de expresión de miARN están asociados a estadificación del cáncer de colon y el pronóstico. Por tanto, los miARN, analizados individualmente o como parte de una firma de miARN, se pueden usar como biomarcadores que permitirán a los médicos predecir el riesgo de supervivencia del paciente con mayor precisión.

10 Las fuertes asociaciones con las proporciones T/N de los miARN con el pronóstico de la supervivencia sugieren que la expresión alterada de miARN puede formar parte de la vía causal en la carcinogénesis del colon y la progresión. Si la expresión alterada de cualquiera de estos miARN es causal para la carcinogénesis, puede ser posible diseñar productos farmacéuticos de tipo antagomir que se puedan usar para tratar el cáncer. Usando perfiles de miARN y terapéuticas basadas en miARN, puede ser posible diseñar estrategias de tratamientos farmacológicos basados en  
15 cuál de estos nueve miARN está alterado. Adicionalmente, estas estrategias pueden ser útiles en la prevención del cáncer de colon en personas con alto riesgo debido a riesgos heredados genéticamente o por antecedentes de cáncer.

## Ejemplo 3

20 **Métodos, reactivos y kits para diagnosticar, estadificar, pronosticar, monitorizar y tratar enfermedades relacionadas con el cáncer de colon**

25 En una realización se proporciona un métodos diagnóstico de evaluación de si un paciente tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o tiene un riesgo mayor de lo normal de desarrollar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, que comprende las etapas de comparar el nivel de expresión de un marcador en una muestra de un paciente y el nivel normal de expresión del marcador en un control, por ejemplo una muestra de un paciente sin una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Un nivel de expresión significativamente mayor del marcador en la muestra del paciente en comparación con el nivel normal es una indicación de que el paciente está  
30 afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o tiene un riesgo mayor de lo normal de desarrollar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

35 Los marcadores se seleccionan de un modo tal que el valor predictivo positivo de los métodos es de al menos aproximadamente un 10% y, en determinadas realizaciones no limitantes, de aproximadamente un 25%, aproximadamente un 50% o aproximadamente un 90%. También se prefiere usar en los métodos marcadores que se expresan de forma diferencial en comparación con las células normales por al menos dos veces, en al menos aproximadamente el 20% y, en determinadas realizaciones no limitantes, aproximadamente un 50% o aproximadamente un 75%.

40 En un método diagnóstico de evaluar si un paciente está afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon (p. ej., nueva detección (“cribado”), detección de recurrencias, pruebas de reflejo), el método comprende comparar: a) el nivel de expresión de un marcador en la muestra de un paciente y b) el nivel normal de expresión del marcador en una muestra control de una enfermedad no relacionada con cáncer de colon. Un nivel de expresión significativamente mayor del marcador en la muestra del paciente en comparación con el nivel normal es una  
45 indicación de que el paciente está afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

50 También se proporcionan métodos diagnósticos para evaluar la eficacia de un tratamiento para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente. Dichos métodos comprenden comparar: a) expresión de un marcador en una primera muestra obtenida del paciente antes de proporcionar al menos una porción del tratamiento al paciente, y b) expresión del marcador en una segunda muestra obtenida del paciente después de proporcionar la porción del tratamiento. Un nivel de expresión significativamente menor del marcador en la segunda muestra respecto a la de la primera muestra es una indicación de que el tratamiento es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente.

55 Se apreciará que en estos métodos el “tratamiento” puede ser cualquier tratamiento para tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente que incluye, entre otros, composiciones farmacéuticas, terapia génica y terapia biológica tal como la administración de anticuerpos y quimiocinas. Por tanto, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para evaluar un paciente antes, durante y después del tratamiento, por ejemplo para evaluar la reducción del estado de enfermedad.

60 En determinados aspectos, los métodos diagnósticos están dirigidos al tratamiento que usa un agente químico o biológico. Estos métodos comprenden comparar: a) la expresión de un marcador en una primera muestra obtenida del paciente y mantenida en presencia del agente químico o biológico, y b) la expresión del marcador en una segunda muestra obtenida del paciente y mantenida en ausencia del agente. Un nivel de expresión  
65 significativamente menor del marcador en la segunda muestra respecto a la de la primera muestra es una indicación de que el agente es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente. En una

realización, la primera y la segunda muestra pueden ser porciones de una única muestra obtenida del paciente o porciones de muestras combinadas obtenidas del paciente.

5 También se proporciona un método de monitorización para evaluar la progresión de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente, comprendiendo el método: a) detectar en la muestra de un paciente en un primer punto de tiempo la expresión de un marcador; b) repetir la etapa a) en un punto de tiempo posterior en el tiempo; y c) comparar el nivel de expresión detectado en las etapas a) y b) y, de este modo, monitorizar la progresión de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente. Un nivel de expresión significativamente mayor del marcador en la muestra en el posterior punto de tiempo del de la muestra en el primer punto de tiempo es una indicación de que la enfermedad relacionada con el cáncer de colon ha progresado, mientras que un nivel de expresión significativamente menor es una indicación de que la enfermedad relacionada con el cáncer de colon ha remitido.

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

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

30 Adicionalmente se proporciona un método de ensayo de evaluación del potencial dañino de un compuesto a la hora de causar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Este método comprende las etapas de: a) mantener alícuotas de las células separados en presencia y en ausencia del compuesto; y b) comparar la expresión de un marcador en cada uno de los alícuotas. Un nivel significativamente mayor de expresión del marcador en un alícuota mantenido en presencia del compuesto con respecto al del alícuota mantenido en ausencia del compuesto es una indicación de que el compuesto posea dicho potencial dañino.

35 Además, se proporciona un método de inhibición de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente. Este método comprende las etapas de: a) obtener una muestra que comprende células del paciente; b) mantener separados alícuotas de a muestra en presencia de una pluralidad de composiciones de ensayo; c) comparar la expresión de un marcador en cada uno de los alícuotas; y d) administrar al paciente al menos una de las composiciones que reduce significativamente el nivel de expresión del marcador en la alícuota que contiene la composición de ensayo, respecto a los niveles de expresión del marcador en presencia de las demás composiciones.

45 El nivel de expresión de un marcador en una muestra se puede evaluar mediante, por ejemplo, detección de la presencia en la muestra de: la correspondiente proteína marcadora o un fragmento de la proteína (p. ej., usando un reactivo, tal como un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario, que se une específicamente a la proteína o fragmento proteico), el correspondiente ácido nucleico marcador (p. ej., un transcrito nucleotídico o un complemento del mismo) o un fragmento del ácido nucleico (p. ej., poniendo en contacto los polinucleótidos transcritos obtenidos de la muestra con un sustrato que tiene fijado al mismo uno o más ácidos nucleicos que tienen la totalidad o un segmento de la secuencia de ácido nucleico o una complementaria del mismo) un metabolito que se produce directamente (es decir, se cataliza) o indirectamente mediante la correspondiente proteína marcadora.

50 Cualquiera de los métodos mencionados anteriormente se puede realizar usando al menos uno o una pluralidad (p. ej., 2, 3, 5 o 10 o más) de marcadores de enfermedad relacionada con el cáncer de colon, que incluye marcadores de enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

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

- En otro aspecto, se proporcionan varios kits diagnósticos y de ensayo. En una realización, un kit es útil para evaluar si un paciente está afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. El kit comprende un reactivo para evaluar la expresión de un marcador. En otra realización, un kit es útil para evaluar la idoneidad de un agente químico o biológico para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente. Dicho kit comprende un reactivo para evaluar la expresión de un marcador y también puede comprender uno o más de estos agentes.
- En una realización adicional, los kits son útiles para evaluar la presencia de células de enfermedad relacionada con el cáncer de colon o tratar enfermedades relacionadas con el cáncer de colon. Dichos kits comprenden un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una proteína marcadora o a un fragmento de la proteína. Dichos kits pueden también comprender una pluralidad de anticuerpos, derivados de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo en los que la pluralidad de dichos agentes anticuerpos se une específicamente a una proteína marcadora o a un fragmento de la proteína.
- En una realización adicional, los kits son útiles para evaluar la presencia de células de enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que el kit comprende una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico marcador o a un fragmento del ácido nucleico. El kit puede también comprender una pluralidad de sondas, en el que cada una de las sondas se une específicamente a un ácido nucleico marcador o a un fragmento del ácido nucleico.
- En un aspecto adicional, se proporcionan métodos para tratar a un paciente afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Dichos métodos pueden comprender reducir la expresión y/o interferir con la función biológica de un marcador. En una realización, el método comprende proporcionar al paciente un oligonucleótido antisentido o un polinucleótido complementario de un ácido nucleico marcador o un segmento de los mismos. Por ejemplo, se puede proporcionar al paciente un polinucleótido antisentido mediante la liberación de un vector que exprese un polinucleótido antisentido de un ácido nucleico marcador o un fragmento del mismo. En otra realización, el método comprende proporcionar al paciente un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una proteína marcadora o a un fragmento de la proteína.
- En un aspecto amplio, se proporciona un método para producir un modelo animal no humano para evaluar al menos una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. El método incluye exponer al animal a dosis repetidas de al menos una sustancia química que se cree que produce cáncer de colon. En determinados aspectos, el método incluye además recoger una o más muestras seleccionadas del animal y comparar la muestra recogida con uno o más indicios de posible inicio o desarrollo de cáncer de colon.
- En un aspecto amplio se proporciona un método de producir el modelo animal, que incluye: mantener al animal en un entorno específico sin sustancias químicas y sensibilizar al animal con al menos una sustancia química que produce cáncer de colon. En determinadas realizaciones, al menos una parte del colon del animal está sensibilizado por múltiples exposiciones secuenciales.
- En otro aspecto amplio, se proporciona un método de cribado de un agente para determinar la eficacia frente a al menos una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. El método incluye, generalmente: administrar al animal al menos un agente, determinar si el agente reduce o agrava uno o más síntomas de la enfermedad relacionada con el cáncer de colon, correlacionar una reducción en uno o más síntomas con la eficacia del agente contra la enfermedad relacionada con el cáncer de colon o correlacionar una falta de reducción de uno o más síntomas con la falta de eficacia del agente.
- El modelo animal es útil para evaluar una o más vías metabólicas que contribuyen a al menos uno de inicio, progresión, gravedad, patología, agresividad, grado, actividad, discapacidad, mortalidad, morbilidad, subclasificación de la enfermedad u otras características patogénicas o patológicas subyacentes de al menos una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. El análisis puede ser uno o más de: agrupación jerárquica, construcción de una red de formas, análisis proteómico por espectroscopia de masas, resonancia por plasmón superficial, modelado estadístico lineal, análisis discriminante parcial de mínimos cuadrados y análisis de regresión lineal múltiple.
- En un aspecto concreto, el modelo animal se evalúa para al menos una enfermedad relacionada con el cáncer de colon examinando un nivel de expresión de uno o más marcadores o un equivalente funcional del mismo.
- A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que un experto en la técnica (p. ej., en cultivo celular, genética molecular, química de ácido nucleico, técnicas de hibridación y bioquímica) entiende habitualmente. Se usan técnicas estándar para métodos moleculares, genéticas y bioquímicas que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., ed. de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (Gait ed., 1984); Mullis *et al.*, la patente de EE.UU. N° 4.683.195;

- Nucleic Acid Hybridization (Hames & Higgins eds., 1984); Transcription And Translation (Hames & Higgins eds., 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller y Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu *et al.*, eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986); The Laboratory Rat, editor jefe: Mark A. Suckow; autores: Sharp y LaRegina. CRC Press, Boston, 1988) y métodos químicos.
- 10 En el presente documento se describen marcadores recién descubiertos asociados a un estado inducido por cáncer de colon de varias células. Se ha descubierto que un nivel de expresión más alto de lo normal de cualquiera de estos marcadores o una combinación de estos marcadores se correlaciona con la presencia de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente. Se proporcionan métodos para detectar la presencia de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en una muestra; la ausencia de en una muestra; el estadio de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon y otras características de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon que son relevantes para la evaluación, prevención, diagnóstico, caracterización y tratamiento de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente. También se proporcionan métodos de tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.
- 15
- 20 Definiciones. Como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tienen los significados indicados en esta sección.
- Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.
- 25
- Un “marcador” es un gen o proteína cuyo nivel de expresión alterado en un tejido o célula con respecto a su nivel de expresión en tejido o células normales o sanos se asocia a un estado de enfermedad.
- 30 El nivel de expresión “normal” de un marcador es el nivel de expresión del marcador en células del sistema del colon de un sujeto o paciente humano no afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Una “sobrexpresión” o “nivel de expresión significativamente más alto” de un marcador hace referencia a un nivel de expresión en una muestra de ensayo que es mayor que el error estándar del ensayo usado para evaluar la expresión, y en determinadas realizaciones, al menos dos veces, y en otras realizaciones, tres, cuatro, cinco o diez veces el nivel de expresión del marcador en una muestra control (p. ej., la muestra de un sujeto sano que no tiene el marcador asociado a la enfermedad) y en determinadas realizaciones, el nivel de expresión promedio del marcador en varias muestras control.
- 35
- Un “nivel de expresión significativamente menor” de un marcador hace referencia a un nivel de expresión en una muestra de ensayo que es al menos dos veces, y en determinadas realizaciones, al menos tres, cuatro, cinco o diez veces menor que el nivel de expresión del marcador en una muestra control (p. ej., la muestra de un sujeto sano que no tiene el marcador asociado a la enfermedad) y en determinadas realizaciones, el nivel de expresión promedio del marcador en varias muestras control.
- 40
- 45 Un kit es cualquier fabricación (p. ej., un envase o contenedor) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo una sonda para detectar específicamente la expresión de un marcador. El kit puede promocionarse, distribuirse o comercializarse como una unidad para realizar los métodos de la presente invención.
- 50 “Proteínas” abarcan proteínas marcadoras y sus fragmentos, proteínas marcadoras variantes y sus fragmentos, péptidos y polipéptidos que comprenden un segmento del marcador de al menos 15 aminoácidos o una proteína marcadora variante y proteínas de fusión que comprenden un marcador proteína marcadora variante o un segmento de al menos 15 aminoácidos de un marcador o proteína marcadora variante.
- Las composiciones, kits y métodos descritos en el presente documento tienen los usos siguientes, entre otros: 1) evaluar si un paciente está afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon; 2) evaluar el estadio de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente humano; 3) evaluar el grado de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente; 4) evaluar la naturaleza de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente; 5) evaluar el potencial de desarrollar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente; 6) evaluar el tipo histológico de las células asociadas a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente; 7) fabricar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o derivados de anticuerpos que son útiles para tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon y/o evaluar si un paciente está afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon; 8) evaluar la presencia de células de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon; 9) evaluar la eficacia de uno o más compuestos de ensayo para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente; 10) evaluar la eficacia de un tratamiento para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente; 11) monitorizar la progresión de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente; 12) seleccionar una composición
- 55
- 60
- 65

o tratamiento para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente; 13) tratar a un paciente afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon; 14) inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente; 15) evaluar el potencial dañino de un compuesto de ensayo; 16) prevenir el inicio de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

### Métodos de cribado

Los modelos animales creados por los métodos descritos en el presente documento permitirán el cribado de agentes terapéuticos útiles para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. De acuerdo con lo anterior, los métodos son útiles para identificar agentes terapéuticos para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Los métodos comprenden administrar un agente candidato a un modelo animal mediante los métodos descritos en el presente documento, evaluar al menos una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el modelo animal en comparación con un modelo animal control al que no se ha administrado el agente candidato. Si al menos una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon es reducción de síntomas o retraso del inicio, el agente candidato es un agente para tratar o prevenir la enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

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

Los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes, incluidas bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, existen numerosos medios disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluida la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, se dispone de bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, plantas y animales, o se producen fácilmente. Adicionalmente, las bibliotecas producidas de forma natural o sintética y los compuestos se modifican fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y se pueden usar para producir bibliotecas combinatorias. En determinadas realizaciones, los agentes candidatos se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, incluidos, a modo de ejemplos no limitantes: bibliotecas biológicas, bibliotecas de fase sólida o de fase en solución paralela; métodos de biblioteca sintética que requiere desconvolución; el método de biblioteca de "una perla un compuesto", y métodos con bibliotecas sintéticas usando selección por cromatografía de afinidad.

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

Los mismos métodos para identificar agentes terapéuticos para tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon también se pueden usar para validar compuestos/agentes principales generados de estudios *in vitro*.

El agente candidato puede ser un agente que regula por aumento o por disminución una o más vías de respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon. En determinadas realizaciones, el agente candidato puede ser un antagonista que afecta a dicha vía.

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

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar, inhibir, aliviar o invertir una respuesta a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. En los métodos descritos en el presente documento, un agente que interfiere con una cascada de señalización se administra a un individuo que lo necesita, tal como, entre otros, pacientes de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en los que dichas complicaciones todavía no son evidentes y aquellos que ya tienen al menos una respuesta a la enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

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

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

### Expresión de un marcador

5 La expresión de un marcador se puede inhibir de varias formas, incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, un oligonucleótido antisentido se puede proporcionar a las células de la enfermedad relacionada con el cáncer de colon con el fin de inhibir la transcripción, la traducción, o ambos, del o los marcadores. Como alternativa, se puede proporcionar a la célula un polinucleótido que codifica un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una proteína marcadora y operablemente unido a una región promotora/reguladora adecuada, con el fin de generar anticuerpos intracelulares que inhiban la función o la actividad de la proteína. La expresión y/o la función de un marcador también se puede inhibir tratando la célula de enfermedad relacionada con el cáncer de colon con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una proteína marcadora. Usando los métodos descritos en el presente documento, varias moléculas, en particular moléculas suficientemente pequeñas que son capaces de atravesar la membrana celular, se pueden someter a cribado con el fin de identificar moléculas que inhiben la expresión de un marcador o inhiben la función de una proteína marcadora. El compuesto identificado de este modo se puede proporcionar al paciente con el fin de inhibir células de enfermedad relacionada con el cáncer de colon del paciente.

20 En las composiciones, kits y métodos descritos en el presente documento se puede usar cualquier marcador o combinación de marcadores, así como cualquier marcador determinado en combinación con los marcadores, En general, es deseable usar marcadores para los que la diferencia entre el nivel de expresión del marcador en las células de enfermedad relacionada con el cáncer de colon del paciente y el nivel de expresión del mismo marcador en las células normales del sistema del colon sea lo más grande posible. Aunque esta diferencia puede ser tan pequeña como el límite de detección del método para evaluar la expresión del marcador, es deseable que la diferencia será al menos mayor que el error estándar del método de evaluación y, en determinadas realizaciones, una diferencia de al menos 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 15-, 20-, 100-, 500-, 1.000 veces o más el nivel de expresión del mismo marcador en tejido normal.

30 Se reconoce que determinadas proteínas marcadoras se secretan al espacio extracelular que rodea a las células. Estos marcadores se usan en determinadas realizaciones de las composiciones, kits y métodos, debido al hecho de que dichas proteínas marcadoras se pueden detectar en una muestra de fluido corporal asociada a cáncer de colon, que puede recogerse más fácilmente de un paciente humano que una muestra de biopsia tisular. Además, las técnicas *in vivo* para detectar una proteína marcadora incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radioactivo cuya presencia y localización en un sujeto se puede detectar mediante técnicas de imagen estándar.

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

45 Se apreciará que las muestras de los pacientes que contienen células de colon se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento. En estas realizaciones, el nivel de expresión del marcador se puede evaluar evaluando la cantidad (p. ej., la cantidad o concentración absoluta) del marcador en una muestra. La muestra celular puede, por supuesto, someterse a diversas técnicas posrecolección, preparativas y de almacenamiento (p. ej., extracción de ácido nucleico y/o proteína, fijación, conservación, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación etc.) antes de evaluar la cantidad del marcador en la muestra.

50 También se apreciará que los marcadores se pueden desprender de las células al sistema digestivo, la corriente sanguínea y/o los espacios intersticiales. Los marcadores desprendidos se pueden analizar mediante, por ejemplo, análisis del suero o el plasma.

55 Las composiciones, kits y métodos se pueden usar para detectar la expresión de proteínas marcadoras que tienen al menos una porción que se muestra sobre la superficie de las células que las expresan. Por ejemplo, los métodos inmunológicos se pueden usar para detectar dichas proteínas sobre células enteras, o se pueden usar métodos de análisis de la secuencia por ordenador para predecir la presencia de al menos un dominio extracelular (es decir, que incluye proteínas secretadas y proteínas que tienen al menos un dominio en la superficie celular). La expresión de una proteína marcadora que tiene al menos una porción que se expresa en la superficie de una célula que expresa, se puede detectar sin lisar necesariamente la célula (p. ej., usando un anticuerpo marcado que se une específicamente a un dominio de superficie celular de la proteína).

65 La expresión de un marcador se puede evaluar mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos para detectar la expresión de un ácido nucleico o proteína transcritos. Ejemplos no imitantes de dichos métodos incluyen métodos inmunológicos para la detección de proteínas secretadas, de superficie celular, citoplasmáticas o nucleares, métodos de purificación de proteínas, función proteica o ensayos de actividad, métodos de hibridación de

ácido nucleico, métodos de transcripción inversa de ácido nucleico y métodos de amplificación de ácido nucleico.

5 En una realización concreta, la expresión de un marcador se evalúa usando un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima), un derivado de anticuerpo (p. ej., un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par proteína-ligando) o un fragmento de anticuerpo (p. je., un anticuerpo de una sola cadena, un dominio hipervariable del anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente a una proteína marcadora o fragmento de la misma, incluyendo una proteína marcadora que ha sufrido toda o una parte de su modificación postraduccional normal.

10 En otra realización concreta, la expresión de un marcador se evalúa preparando ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) de las células en una muestra de paciente e hibridando el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complementario de un ácido nucleico marcador o un fragmento del mismo. El ADNc se puede amplificar, opcionalmente, usando cualquiera de varios métodos de reacción en cadena de la polimerasa antes de hibridar con el polinucleótido de referencia, preferentemente no se amplifica. La expresión de uno o más marcadores puede detectarse también usando PCR cuantitativa para evaluar el nivel de expresión del o los marcadores. Como alternativa, se puede usar cualquiera de los muchos métodos de detección de mutaciones, variantes (p. ej., polimorfismos de nucleótido único, deleciones etc.) de un marcador para detectar la aparición de un marcador en un paciente.

20 En una realización relacionada, una mezcla de polinucleótidos transcritos obtenidos de la muestra se pone en contacto con un sustrato al que se ha fijado un polinucleótido complementario u homólogo a al menos una porción (p. ej., al menos, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500, o más residuos nucleotídicos) de un ácido nucleico marcador. Si los polinucleótidos complementarios u homólogos se detectan de forma diferencial sobre el sustrato (p. ej., se pueden detectar usando diferentes cromóforos o fluoróforos, o fijarse a diferentes posiciones seleccionadas), los niveles de expresión de una pluralidad de marcadores se pueden evaluar de forma simultánea usando un único sustrato (p. ej., una micromatriz de "circuito génico" de polinucleótidos fijados en determinadas posiciones). Cuando se usa un método de evaluación de la expresión de marcadores que implica hibridación de un ácido nucleico con otro, se desea que la hibridación se realice en condiciones de hibridación rigurosas.

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

40 En determinadas realizaciones, la etapa de determinación comprende un ensayo seleccionado de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos basados en fluorescencia y ensayos de ultraalto rendimiento, por ejemplo ensayos de resonancia en plasmón superficial (SPR) o espectroscopia de correlación con fluorescencia. En dichas realizaciones, el sensor SPR es útil para la observación directa en tiempo real de interacciones biomoleculares, ya que SPR es sensible a los cambios del índice de refracción en un minuto en una superficie metálica-dieléctrica. La SPR es una técnica de superficie que es sensible a los cambios al  $10^5$  a  $10^6$  de índice de refracción (IF) dentro de aproximadamente 200 nm de la interfaz sensor/muestra de SPR. Por tanto, la espectroscopia SPR es útil para monitorizar el crecimiento de películas orgánicas finas depositadas sobre la capa sensora.

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

55 Se entiende que por cribado de rutina de muestras adicionales de pacientes usando uno o más de los marcadores se iniciará que determinados de los marcadores está sobreexpresados en células de varios tipos, incluidas de enfermedades específicas relacionadas con cáncer de colon.

60 Además, dado que se correlaciona un mayor número de muestras de pacientes se evalúan según la expresión de los marcadores y los desenlaces de los pacientes individuales de los que se obtuvieron las muestras, también se confirmará que la expresión alterada de determinados marcadores se correlaciona estrechamente con una enfermedad relacionada con el cáncer de colon y que la expresión alterada de otros marcadores se correlaciona estrechamente con otras enfermedades. Por tanto, las composiciones, kits y métodos son útiles para caracterizar uno o más del estadio, grado, tipo histológico y naturaleza de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en los pacientes.

65 Cuando las composiciones, kits y métodos se usan para caracterizad uno o más del estadio, grado, tipo histológico y

naturaleza de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente, se desea que el marcador o panel de marcadores se selecciona de un modo tal que se obtenga un resultado positivo en al menos aproximadamente el 20% y, en determinadas realizaciones, al menos aproximadamente el 40 %, 60 %, u 80 %, y en sustancialmente todos los pacientes afectados por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon del correspondiente estadio, grado, tipo histológico o naturaleza. El marcador o panel de marcadores de la invención se puede seleccionar de un modo tal que se obtenga un valor predictivo positivo de más de aproximadamente 10% para la población general (en un ejemplo no limitante, acoplado con una especificidad del ensayo superior al 84%).

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

Con el fin de maximizar la sensibilidad de las composiciones, kits y métodos (es decir, mediante interferencia atribuible a las células procedentes de sistema no colónico en una muestra de un paciente), es deseable que el marcador usado en el mismo sea un marcador que tenga una distribución tisular restringida, por ejemplo que normalmente no se expresa en un tejido que no pertenece al sistema colónico.

Se reconoce que las composiciones, kits y métodos serán de utilidad concreta para pacientes que tienen un riesgo potenciado de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon y sus asesores médicos. Los pacientes que se ha reconocido que tienen un riesgo potenciado de desarrollar una enfermedad relacionada con cáncer de colon incluyen, por ejemplo, pacientes que tienen antecedentes familiares de una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

El nivel de expresión de un marcador en tejido de sistema colónico humano normal se puede evaluar de varias formas. En una realización, este nivel de expresión normal se evalúa evaluando el nivel de expresión del marcador en una porción de células del sistema colónico que parecen normales y comparando este nivel de expresión normal con el nivel de expresión en una porción de células del sistema colónico que se sospecha que son anormales. Como alternativa, y particularmente cuando aparece más información como resultado de realización rutinaria de los métodos descritos en el presente documento, se pueden usar los valores promedio en la población para la expresión normal de los marcadores. En otras realizaciones, el nivel de expresión 'normal' de un marcador se puede determinar evaluando la expresión del marcador en la muestra de un paciente obtenida de un paciente no afectado por cáncer de colon, de la muestra de un paciente obtenida de un paciente antes del inicio sospechado de una enfermedad relacionada con cáncer de colon en el paciente, de muestras de pacientes archivadas y similares.

En el presente documento también se proporcionan composiciones, kits y métodos para evaluar la presencia de células de enfermedad relacionada con cáncer de colon en una muestra (p. ej., una muestra de tejido archivada o una muestra obtenida de un paciente). Estas composiciones, kits y métodos son sustancialmente iguales a los descritos anteriormente a excepción de que, cuando es necesario, las composiciones, kits y métodos se adaptan para usar con muestras distintas a las muestras de pacientes. Por ejemplo, cuando la muestra a usar es una muestra de tejido humano incluida en parafina y archivada, puede ser necesario ajustar la proporción de compuestos en las composiciones, en los kits o en los métodos usados para evaluar los niveles de expresión del marcador en la muestra.

### **Kits y reactivos**

Los kits son útiles para evaluar la presencia de células de enfermedad relacionada con el cáncer de colon (p. ej., en una muestra tal como una muestra de un paciente). El kit comprende una pluralidad de reactivos cada uno de los cuales es capaz de unirse específicamente con un ácido nucleico o proteína marcadores. Reactivos adecuados para unirse con una proteína marcadora incluye anticuerpos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y similares. Reactivos adecuado para unirse a un ácido nucleico marcador (p. ej., un ADN genómico, un ARNm, un ARNm de corte y empalme, un ADNc o similares) incluyen ácidos nucleicos complementarios. Por ejemplo, los reactivos de ácido nucleico pueden incluir oligonucleótidos (marcados o no marcados) fijados a un sustrato, oligonucleótidos marcados no unidos a un sustrato, pares de cebadores de PCR, sondas balizas moleculares y similares.

Los kits pueden comprender, opcionalmente, componentes adicionales útiles para realizar los métodos descritos en el presente documento. A modo de ejemplo, el kit puede comprender fluidos (p. ej., tampón SSC) adecuados para hibridar con ácidos nucleicos complementarios o para unir un anticuerpo con una proteína con la que se une específicamente, uno o más compartimentos de la muestra, un material de instrucciones que describe el

funcionamiento del método, una muestra de células normales del sistema colónico, una muestra de células de enfermedad relacionada con el cáncer de colon y similares.

#### **Método de producción de anticuerpos**

5 En el presente documento también se proporciona un método de fabricar un hibridoma aislado que produce un anticuerpo útil para evaluar si un paciente está afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. En este método se sintetiza o aísla una proteína o péptido que comprende todo o un segmento de una proteína  
10 marcadora (p. ej., mediante purificación de una célula en la que se expresa o mediante transcripción y traducción de un ácido nucleico que codifica la proteína o péptido *in vivo* o *in vitro*). Por ejemplo, un vertebrado, un mamífero tal como un ratón, rata, conejo u oveja, se inmuniza usando la proteína o péptido. El vertebrado puede inmunizarse, opcionalmente (y preferentemente) al menos una vez más con la proteína o péptido de modo que el vertebrado exhiba una sólida respuesta inmunitaria a la proteína o péptido. Se aíslan esplenocitos del vertebrado inmunizado y se fusionan con una línea celular inmortalizada para formar hibridomas usando cualquiera de varios métodos. Los  
15 hibridomas formados de este modo se someten a cribado usando métodos estándar para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente a la proteína marcadora o a un fragmento de la misma. En el presente documento también se proporcionan hibridomas fabricados mediante este método y anticuerpos fabricados usando dichos hibridomas.

#### **Método de evaluación de la eficacia**

En el presente documento también se proporciona un método de evaluación de la eficacia de un compuesto de ensayo para inhibir células de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Como se ha descrito con anterioridad, las diferencias en el nivel de expresión de los marcadores se correlacionan con el estado anormal de  
25 las células del sistema colónico. Aunque se reconoce que es probable que los cambios en los niveles de expresión de determinados marcadores sean el resultado del estado anormal de las células del sistema colónico, también se reconoce que los cambios en los niveles de expresión de otros de los marcadores inducen, mantienen y estimulan el estado anormal de dichas células. Por tanto, los compuestos que inhiben una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en un paciente hará que el nivel de expresión de uno o más de los marcadores cambie hasta un nivel más cercano al nivel de expresión normal para dicho marcador (es decir, el nivel de expresión para el marcador en las  
30 células normales del sistema colónico).

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

En una realización, las muestras son células de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon obtenidas de un  
45 paciente y una pluralidad de compuestos que se cree que son eficaces para inhibir varias enfermedades relacionadas con el cáncer de colon se analizan con el fin de identificar el compuesto que es probable que inhiba mejor la enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente.

Asimismo, el método puede usarse para evaluar la eficacia de un tratamiento para inhibir una enfermedad  
50 relacionada con el cáncer de colon en un paciente. En este método se evalúa el nivel de expresión de uno o más marcadores en un par de muestras (una sometida al tratamiento, la otra no sometida al tratamiento). Al igual que con el método de evaluación de la eficacia de compuestos de ensayo, si el tratamiento indique un nivel de expresión significativamente menor de un marcador, el tratamiento es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Como anteriormente, si en este método se usan muestras de un paciente determinado, se pueden  
55 evaluar tratamientos alternativos *in vitro* para seleccionar un tratamiento que con mucha probabilidad sea eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en el paciente.

Como se ha descrito con anterioridad, el estado anormal de células de colon humanas se correlaciona con los  
60 cambios en los niveles de expresión de los marcadores. También se proporciona un método para evaluar el potencial dañino de un compuesto de ensayo. Este método comprende mantener alícuotas separados de células de colon humanas en presencia o ausencia del compuesto de ensayo. La expresión de un marcador en cada uno de los alícuotas se compara. Un nivel significativamente mayor de expresión de un marcador en un alícuota mantenido en presencia del compuesto de ensayo (con respecto al alícuota mantenido en ausencia del compuesto de ensayo) es una indicación de que el compuesto de ensayo posee un potencial dañino. El potencial dañino de varios compuestos  
65 de ensayo se puede evaluar comparando el grado de potenciación o inhibición del nivel de expresión de los marcadores relevantes, comparando el número de marcadores para los cuales el nivel de expresión está potenciado

o inhibido, o mediante comparación de ambos.

Varios aspectos se describen con más detalle en las subsecciones siguientes.

## 5 Proteínas y anticuerpos aislados

Un aspecto pertenece a las proteínas marcadoras aisladas y a porciones biológicamente activas de las mismas, así como fragmentos polipeptídicos adecuados para usar como inmunógenos para producir anticuerpos dirigidos contra una proteína marcadora o un fragmento de la misma. En una realización, la proteína marcadora nativa se puede aislar de células o tejidos mediante un esquema de purificación adecuado usando técnicas estándar de purificación de proteínas. En otra realización, una proteína o péptido que comprende la totalidad o un segmento de la proteína marcadora se produce mediante técnicas de ADN recombinante. De forma alternativa a la expresión recombinante, dicha proteína o péptido se pueden sintetizar químicamente usando técnicas de síntesis peptídica estándar.

Una proteína "aislada" o "purificada" o una porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la que la proteína deriva o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína en las que la proteína está separada de los componentes celulares de las células de las que se aísla o produce de forma recombinante. Por tanto, la proteína sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones proteína que tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en el presente documento "proteína contaminante").

Cuando la proteína o la o una porción biológicamente activa de la misma se producen de forma recombinante, están, preferentemente, sustancialmente libres de medio de cultivo, es decir el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de proteína. Cuando la proteína se produce mediante síntesis química, preferentemente está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir está separado de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de proteínas. De acuerdo con esto, dichas preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) de precursores químicos u otros compuestos distintos al polipéptido de interés.

Porciones biológicamente activas de una proteína marcadora incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora, que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa y exhiben al menos una actividad de la correspondiente proteína de longitud completa. Normalmente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la correspondiente proteína de longitud completa. Una porción biológicamente activa de una proteína marcadora puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, una longitud de 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos. Además, otras porciones biológicamente activas en las que otras regiones de la proteína marcadora están delecionadas se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y evaluar para determinar una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de la proteína marcadora. En determinadas realizaciones, las proteínas útiles son sustancialmente idénticas (p. ej., al menos aproximadamente 40% y, en determinadas realizaciones 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 %) con una de estas secuencias y conservan la actividad funcional de la correspondiente proteína marcadora de origen natural aunque difieren en la secuencia de aminoácidos debido a variación alélicas natural o a mutagénesis.

Además, se puede usar bibliotecas de segmentos de una proteína marcadora para generar una población variada de polipéptidos para cribado y la posterior selección de proteínas marcadoras variantes o segmentos de las mismas.

## 50 Medicina predictiva

En el presente documento también se proporciona usos de los modelos animales y marcadores en el campo de la medicina predictiva en la que se usan ensayos diagnósticos, ensayos pronósticos, farmacogenómica y monitorización de ensayos clínicos para fines pronósticos (predictivos) para tratar de este modo a un individuo de forma profiláctica. De acuerdo con lo anterior, en el presente documento también se proporcionan ensayos diagnósticos para determinar el nivel de expresión de una o más proteínas o ácidos nucleicos marcadores con el fin de determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Dichos ensayos se pueden usar para fines pronósticos o predictivos para tratar de este modo a un individuo de forma profiláctica antes del inicio de la enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

En otro aspecto, los métodos son útiles para al menos un cribado periódico del mismo individuo para ver si dicho individuo ha estado expuesto a sustancias químicas o toxinas que cambian sus patrones de expresión.

Otro aspecto más pertenece a la monitorización de la influencia de los agentes (p. ej., fármacos u otros compuestos administrados bien para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o para tratar o prevenir cualquiera de los demás trastornos (p. ej., con el fin de entender cualquier efecto del sistema que dicho tratamiento

pueda tener) sobre la expresión o actividad de un marcador en ensayos clínicos.

### **Farmacogenómica**

5 Los marcadores también son útiles como marcadores farmacogenómicos. Como se usa en el presente documento, un “marcador farmacogenómico” es un marcador bioquímico objetivo cuyo nivel de expresión se correlaciona con una respuesta de fármaco clínico específica o con la sensibilidad en un paciente. La presencia o la cantidad de expresión del marcador farmacogenómico está relacionada con la respuesta predicha del paciente y, más particularmente, del tumor del paciente al tratamiento con un fármaco específico o clase de fármacos. Evaluando la presencia o la cantidad de expresión de uno o más marcadores farmacogenómicos en un paciente, se puede seleccionar un tratamiento farmacológico que sea muy adecuado para el paciente o que se ha predicho que tiene un mayor grado de éxito.

### **Monitorización de ensayos clínicos**

15 La monitorización de la influencia de agentes (p. ej., compuestos farmacológicos) sobre el nivel de expresión de un marcador se puede aplicar no solo a el cribado básico de fármacos sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente para afectar a la expresión de un marcador se puede monitorizar en ensayos clínicos de sujetos que reciben tratamiento para una enfermedad relacionada con cáncer de colon.

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

30 Por ejemplo, el incremento de la expresión del o los genes marcadores durante el curso del tratamiento puede indicar dosificación ineficaz y el deseo de incrementar la dosis. Por el contrario, la disminución de la expresión del o los genes marcadores puede indicar un tratamiento eficaz y la no necesidad de cambiar la dosis.

### **Medios legibles en aparato electrónico, sistemas, matrices y métodos de usar los mismos**

35 Como se usa en el presente documento, “medio legible en aparato electrónico” significa cualquier medio adecuado para almacenar, contener o retener datos o información que se puede leer y a la que se puede acceder directamente con un aparato electrónico. Dichos medios pueden incluir, entre otros: medios de almacenamiento magnético, tales como disquetes, medios de almacenamiento en disco duro y cintas magnéticas; medios de almacenamiento óptico tales como discos compactos; medios de almacenamiento electrónicos tales como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares, y discos duros generales e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnético/óptico. El medio está adaptado o configurado para tener registrado en su interior un marcador como se ha descrito en el presente documento.

45 Como se usa en el presente documento, con la expresión “aparato electrónico” se pretende incluir cualquier aparato de computación o método adecuado u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Ejemplos de aparatos electrónicos adecuados para usar con la presente invención incluyen aparatos de computación autónomos, redes, incluidas una red de área local (LAN), una red de área amplia (WAN), Internet, Intranet) y Extranet; dispositivos electrónicos tales como agendas digitales personales (PDA), móviles, buscadores y similares; y sistemas de procesamiento locales y distribuidos.

50 Como se usa en el presente documento, “registrado” hace referencia a un proceso para almacenar o codificar información sobre el medio de lectura del aparato electrónico. Los expertos en la técnica pueden adoptar fácilmente cualquier método de registro de información en medios para generar materiales que comprendan los marcadores descritos en el presente documento.

55 Se pueden usar varios programas de software y formatos para almacenar la información del marcador de la presente invención en el medio legible en aparato electrónico. Se puede usar cualquier número de formatos de estructuración del procesador de datos (p. ej., archivo de texto o base de datos) con el fin de obtener o crear un medio en el que se hayan registrado los marcadores. Proporcionando los marcadores en forma legible, se puede acceder de forma rutinaria a la información sobre la secuencia marcadora para varios fines. Por ejemplo, un experto en la técnica puede usar las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos en forma legible para comparar una secuencia diana o motivo estructural diana con la información de la secuencia almacenada dentro del medio de conservación de los datos. Los medios de búsqueda se usan para identificar fragmentos o regiones de las secuencias que equivalen a una secuencia diana o motivo diana concretos.

65 Por tanto, en el presente documento también se proporciona un medio para conservar las instrucciones para realizar

un método para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, en el que el método comprende las etapas de determinar la presencia o ausencia de un marcador y basándose en la presencia o ausencia del marcador, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o una predisposición a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon y/o recomendar un tratamiento concreto para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o una afección previa a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

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

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

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

En el presente documento también se proporciona una matriz que se puede usar para analizar la expresión de uno o más genes en la matriz. En una realización, la matriz se puede usar para analizar la expresión génica en un tejido para determinar la especificidad tisular de los genes en la matriz. De este modo se puede analizar la expresión de aproximadamente 7.000 o más genes de forma simultánea. Esto permite desarrollar un perfil que muestre una batería de genes expresados específicamente en uno o más tejidos.

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

Dicha determinación es útil para, por ejemplo, conocer el efecto de las interacciones célula-célula a nivel de expresión génica. Si un agente se administra terapéuticamente para tratar un tipo celular pero tiene un efecto indeseable sobre otro tipo celular, el método comprende un ensayo para determinar la base molecular del efecto indeseable y, por tanto, proporciona la oportunidad de coadministrar un agente que contrarreste, o de otro modo que trate, el efecto indeseable. De un modo similar, dentro de un único tipo celular se pueden determinar los efectos biológicos no deseables a nivel molecular. Por tanto, se pueden determinar los efectos de un agente sobre la expresión de otro dirigido al gen diana y se pueden contrarrestar.

En otra realización, la matriz se puede usar para monitorizar el curso del tiempo de expresión de uno o más genes en la matriz. Esto se puede producir en varios contextos biológicos, como se divulga en el presente documento, por ejemplo el desarrollo de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon, la progresión de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon y procesos, tales como la transformación celular, asociados a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

La matriz también es útil para determinar el efecto de la expresión de un gen o de la expresión de otros genes en la

misma célula o en células diferentes. Esto proporciona, por ejemplo, una selección de dianas moleculares alternativas para intervención terapéutica si no se puede regular la diana última o corriente abajo.

- 5 La matriz también es útil para determinar patrones de expresión diferenciales de uno o más genes en células normales y anormales. Esto proporciona una batería de genes que podrían servir como diana molecular para diagnóstico o intervención terapéutica.

**Marcadores sustitutos**

- 10 Los marcadores pueden servir como marcadores sustitutos de uno o más trastornos o estados de enfermedad o para afecciones con conducen a un estado de enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Como se usa en el presente documento, un “marcador sustituto” es un marcador bioquímico objetivo que se correlaciona con la ausencia o presencia de una enfermedad o trastorno, o con la progresión de una enfermedad o trastorno. La presencia o cantidad de dichos marcadores es independiente de la enfermedad. Por tanto, estos marcadores  
15 pueden servir para indicar si un ciclo concreto de tratamiento es eficaz en la remisión de un estado de enfermedad o trastorno. Los marcadores sustitutos son de uso concreto cuando la presencia o extensión del estado de enfermedad o trastorno es difícil, de evaluar con las metodologías estándar o cuando se desea una evaluación de la progresión de una enfermedad antes de alcanzar un criterio de valoración clínico potencialmente peligroso.

- 20 Los marcadores también sin útiles como marcadores farmacodinámicos. Como se usa en el presente documento, un “marcador farmacodinámico” es un marcador bioquímico objetivo que se correlaciona específicamente con los efectos del os fármacos. La presencia o cantidad de un marcador farmacodinámico no está relacionada con el estado de enfermedad o trastorno para el cual se está administrando el fármaco; por tanto, la presencia o cantidad del marcador es indicativa de la presencia o actividad del fármaco en un sujeto. Por ejemplo, un marcador  
25 farmacodinámico puede ser indicativo de la concentración del fármaco en un tejido biológico, en cuanto a que el marcador se expresa o transcribe o no se expresa ni transcribe en dicho tejido en relación con el nivel del fármaco. De este modo, la distribución o captación del fármaco se puede monitorizar mediante el marcador farmacodinámico. De un modo similar, la presencia o cantidad del marcador farmacodinámico puede estar relacionada con la presencia o cantidad del producto metabólico de un fármaco, de modo que la presencia o cantidad del marcador es  
30 indicativa de la tasa de degradación relativa del fármaco *in vivo*.

- Los marcadores farmacodinámicos son de uso concreto en el aumento de la sensibilidad de la detección de los efectos del fármaco, en particular cuando el fármaco se administra a dosis bajas. Dado que incluso una cantidad pequeña de un fármaco puede ser suficiente para activar múltiples ciclos de transcripción o expresión del marcador,  
35 el marcador amplificado puede estar en una cantidad que se puede detectar más fácilmente que el propio fármaco. Asimismo, el marcador puede detectarse con mayor facilidad debido a la naturaleza del propio marcador; por ejemplo, usando los métodos descritos en el presente documento se pueden usar anticuerpos en un sistema de detección basada en la inmunidad para un marcador proteico o se pueden usar sondas radiomarcadas específicas del marcador para detectar un marcador de ARNm. Además, el uso de un marcador farmacodinámico puede ofrecer  
40 una predicción basada en el mecanismo del riego debido al tratamiento farmacológico más allá de la serie de posibles observaciones directas.

**Protocolos para análisis**

- 45 El método de análisis de enfermedades relacionadas con el cáncer de colon comprende, por ejemplo, medir el nivel de expresión de cada marcador génico en una muestra biológica de un sujeto en el tiempo y comparar el nivel con el del gen marcador en una muestra biológica control.

- 50 Cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento y el nivel de expresión se expresa de forma diferencial (por ejemplo, mayor o menor que en el control), se considera que el sujeto está afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Cuando el nivel de expresión del gen marcador entra dentro del intervalo permisible, es improbable que el sujeto esté afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

- 55 El valor estándar para el control se puede predeterminar midiendo el nivel de expresión del gen marcador en el control con el fin de comparar los niveles de expresión. Por ejemplo, el valor estándar se puede determinar basándose en el nivel de expresión del gen marcador mencionado anteriormente en el control. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el intervalo permisible se toma como  $\pm 2S.D$  basándose en el valor estándar. Una vez determinado el valor estándar, el método de análisis se puede realizar midiendo solo el nivel de expresión en una  
60 muestra biológica de un sujeto y comparando el valor con el valor estándar determinado para el control.

- Los niveles de expresión de genes marcadores incluyen la transcripción de los genes marcadores en ARNm y la traducción en proteínas. Por tanto, un método de análisis para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se realiza basándose en una comparación de la intensidad de la expresión de ARNm correspondiente a los genes  
65 marcadores o el nivel de expresión de proteínas codificadas por los genes marcadores.

La medición de los niveles de expresión de genes marcadores en el análisis de una enfermedad relacionada con el

cáncer de colon se puede llevar a cabo de acuerdo con varios métodos de análisis génico. Específicamente se puede usar, por ejemplo, una técnica de hibridación usando ácidos nucleicos que hibridan con estos genes como sondas o una técnica de amplificación génica usando ADN que hibrida con los genes marcadores como cebadores.

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

10 Además, debe entenderse que los genes de animales superiores generalmente acompañan al polimorfismo en una frecuencia elevada. También hay muchas moléculas que producen isoformas que comprenden secuencias de aminoácidos mutuamente diferentes durante el proceso de corte y empalme. Cualquier gen asociado a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon que tiene una actividad similar a la de un gen marcador está incluido en los genes marcadores, incluso si tiene diferencias en la secuencia nucleotídica debido al polimorfismo o ser una isoforma.

15 También debe entenderse que los genes marcadores pueden incluir homólogos de otras especies además del ser humano. Por tanto, a menos que se especifique lo contrario, la expresión "gen marcador" hace referencia a un homólogo del gen marcador único de la especie o a un gen marcador extraño que se ha introducido en un individuo.

20 Asimismo, entenderse que un "homólogo de un gen marcador" hace referencia a un gen derivado de una especie distinta al ser humano, que puede hibridar con el gen marcador humano como sonda en condiciones rigurosas. Dichas condiciones rigurosas son conocidas para el experto en la técnica, que puede seleccionar una condición adecuada para producir una rigurosidad igual experimental o empíricamente.

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

30 Además, "complementario" no solo significa aquéllos que son completamente complementarios a una región de al menos 15 nucleótidos seguidos sino también aquéllos que tienen una homología de la secuencia nucleotídica de al menos un 40% en ciertos casos, un 50% en ciertos casos, un 60 % in en ciertos casos, un 70 % en ciertos casos, al menos un 80 %, 90 % y 95 % o superior. El grado de homología entre las secuencias nucleotídicas se puede determinar mediante un algoritmo, BLAST etc.

35 Estos polinucleótidos son útiles como sonda para detectar un gen marcador o como cebador para amplificar un gen marcador. Cuando se usa como cebador, el polinucleótido comprende normalmente de 15 pb a 100 pb y, en determinadas realizaciones, de 15 pb a 35 pb de nucleótidos. Cuando se usa como sonda, un ADN comprende la totalidad de la secuencia nucleotídica del gen marcador (o la hebra complementaria de la misma) o una secuencia  
40 parcial de la misma que tiene al menos 15 pb de nucleótidos. Cuando se usa como cebador, la región 3' debe ser complementaria al gen marcador, mientras que la región 5' se puede unir a una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción o una marca.

45 Los "polinucleótidos" pueden ser ADN o ARN. Estos polinucleótidos pueden ser de origen natural o sintético. Asimismo, el ADN usado como sonda para hibridación normalmente está marcado. Los expertos en la técnica entienden fácilmente dichos métodos de marcaje. En el presente documento, el término "oligonucleótido" significa un polinucleótido con un grado relativamente bajo de polimerización. Los oligonucleótidos están incluidos en los polinucleótidos.

50 Los análisis para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon usando técnicas de hibridación se pueden realizar usando, por ejemplo, hibridación de tipo Northern, hibridación por transferencia de puntos o la técnica de la micromatriz de ADN. Además, se pueden usar técnicas de amplificación génica, como el método de RT-PCR. Usando el método de monitorización por amplificación mediante PCR durante la etapa de amplificación génica en la RT-PCR, se puede conseguir un análisis más cuantitativo de la expresión de un gen marcador.

55 En el método de monitorización por amplificación mediante PCR, la diana de detección (ADN o transcrito inverso del ARN) hibrida con las sondas marcadas con un pigmento fluorescente y un inactivador que absorbe la fluorescencia. Cuando la PCR procede y la Taq polimerasa degrada la sonda con su actividad exonucleasa 5'-3', el pigmento fluorescente y el inactivador se alejan uno de otro y se detecta la fluorescencia. La fluorescencia se detecta en  
60 tiempo real. Midiendo de forma simultánea una muestra estándar en la que se conoce el número de copias de una diana, es posible determinar el número de copias de la diana en la muestra sujeto con el número de ciclo en el que la amplificación por PCR es lineal. Asimismo, un experto en la técnica reconoce que el método de monitorización por amplificación con PCR se puede llevar a cabo usando cualquier método adecuado.

65 El método de análisis para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon también se puede llevar a cabo detectando una proteína codificada por un gen marcador. En lo sucesivo en el presente documento, una proteína

codificada por un gen marcador se describe como "proteína marcadora". Para estos métodos de ensayo, por ejemplo el método de transferencia Western, el método de inmunoprecipitación y el método de ELISA se pueden emplear usando un anticuerpo que se une a cada proteína marcadora.

5 Los anticuerpos usados en la detección que se unen a la proteína marcadora se pueden producir mediante cualquier técnica adecuada. Asimismo, con el fin de detectar una proteína marcadora, tal como un anticuerpo, se pueden marcar adecuadamente. Como alternativa, en lugar de marcar el anticuerpo, una sustancia que se une específicamente al anticuerpo, por ejemplo proteína A o proteína G, puede estar marcada para detectar la proteína marcadora de forma indirecta. Más específicamente, dicho método de detección puede incluir el método de ELISA.

10 Una proteína o un péptido parcial de la misma usada como antígeno se puede obtener, por ejemplo, insertando un gen marcador o una porción del mismo en un vector de expresión, introduciendo la construcción en una célula huésped adecuada para producir un transformante, cultivar el transformante para expresar la proteína recombinante, y purificar la proteína recombinante expresada del cultivo o del sobrenadante del cultivo. Como alternativa, la secuencia de aminoácidos codificada por un gen o un oligopéptido que comprende una porción de la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc de longitud completa se sintetizan químicamente para usar como inmunógeno.

15 Además, un análisis para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se puede realizar usando un índice no solo el nivel de expresión de un gen marcador sino también la actividad de una proteína marcadora en una muestra biológica. La actividad de una proteína marcadora significa la actividad intrínseca de la proteína. Se pueden usar varios métodos para medir la actividad de cada proteína.

20 Incluso si no se ha diagnosticado a un paciente como afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon en una prueba de rutina a pesar de los síntomas indicativos de estas enfermedades, si dicho paciente sufre una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o no se puede determinar fácilmente realizando una prueba de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

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

30 Además, las pruebas son útiles para determinar si una enfermedad relacionada con el cáncer de colon está mejorando en un paciente. En otras palabras, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para juzgar el efecto terapéutico de un tratamiento para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Adicionalmente, cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento, un incremento o disminución del nivel de expresión del gen marcador en un paciente con un diagnóstico de afectado por una enfermedad relacionada con el cáncer de colon implica que la enfermedad ha progresado más.

35 La gravedad y/o susceptibilidad a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon también se puede determinar basándose en la diferencia en los niveles de expresión. Por ejemplo, cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento, el grado de incremento del nivel de expresión del gen marcador se correlaciona con la presencia y/o gravedad de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon.

#### 45 **Modelos animales**

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

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

55 En una realización, un modelo animal para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se puede crear controlando el nivel de expresión de un gen homólogo o administrar un gen homólogo. El método puede incluir crear un modelo animal para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon controlando el nivel de expresión de un gen seleccionado del grupo de genes descritos en el presente documento. En otra realización, el método puede incluir crear un modelo animal para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon administrando la proteína codificada por un gen descrito en el presente documento o administrando un anticuerpo frente a la proteína. Debe entenderse que en otras realizaciones determinadas, el marcador puede estar sobreexpresado de modo que el

marcador se puede medir usando los métodos adecuados.

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

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

El modelo animal es útil para aclarar el mecanismo subyacente a una enfermedad relacionada con el cáncer de colon y también para analizar la seguridad de los compuestos obtenidos mediante cribado. Por ejemplo, cuando un modelo animal desarrolla los síntomas de una enfermedad relacionada con el cáncer de colon o cuando un valor medido implicado en una determinada enfermedad relacionada con el cáncer de colon se altera en el animal, se puede construir un sistema de cribado para explorar compuestos que tienen actividad para aliviar la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, la expresión “un incremento en el nivel de expresión” hace referencia a uno cualquiera de los siguientes: cuando un gen marcador introducido como gen extraño se expresa artificialmente, cuando la transcripción de un gen marcador intrínseco al animal sujeto y la traducción del mismo en la proteína están potenciados o cuando la hidrólisis de la proteína, que es el producto de la traducción, está suprimida. Como se usa en el presente documento, la expresión “una disminución en el nivel de expresión” se refiere al estado en el cual transcripción de un gen marcador del animal sujeto y la traducción del mismo en la proteína están inhibidos o el estado en el que la hidrólisis de la proteína, que es el producto de la traducción, está potenciada. El nivel de expresión de un gen se puede determinar mediante, por ejemplo, una diferencia en la intensidad de la señal en un circuito de ADN. Además, la actividad del producto de la traducción, la proteína, se puede determinar comparando con la del estado normal.

También entra dentro del alcance contemplado que el modelo animal puede incluir animales transgénicos, incluidos, por ejemplo, animales en los que se ha introducido un gen marcador y se ha expresado artificialmente, animales defectivos en el gen marcador y animales defectivos en los que otro gen se ha sustituido por otro gen marcador. Un animal transgénico en el que se ha introducido un ácido nucleico antisentido o un gen marcador, una ribozima, un polinucleótido que tiene un efecto de ARNi o un ADN que funciona como ácido nucleico señuelo o similar, se puede usar como animal transgénico. Dichos animales transgénicos también incluyen, por ejemplo, animales en los que la actividad de una proteína marcadora se ha potenciado o suprimido introduciendo una o más mutaciones en la región de codificación del gen o la secuencia de aminoácidos se ha modificado para convertirse en resistente o susceptible a la hidrólisis. Las mutaciones en una secuencia de aminoácidos incluyen sustituciones, deleciones, inserciones y adiciones.

Además, la propia expresión de un gen marcador se puede controlar introduciendo una o más mutaciones en la región reguladora de la transcripción del gen. Los expertos en la técnica entienden dicha sustituciones de aminoácidos. Asimismo, el número de aminoácidos que están mutados no está particularmente restringido, siempre que se mantenga la actividad. Normalmente está en 50 aminoácidos, en ciertas realizaciones no limitantes e 30 aminoácidos, en n10 aminoácidos o en 3 aminoácidos. El sitio de la mutación puede ser cualquier sitio, siempre que se mantenga la actividad.

En otro aspecto más, en el presente documento se proporcionan métodos de cribado para compuestos candidatos a agentes terapéuticos para tratar una enfermedad relacionada con el cáncer de colon. Uno o más genes marcadores se seleccionan del grupo de genes descrito en el presente documento. Un agente terapéutico para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se puede obtener seleccionando un compuesto capaz de aumentar o disminuir el nivel de expresión del o los genes marcadores.

Debe entenderse que la expresión “un compuesto que aumenta nivel de expresión de un gen” hace referencia a un compuesto que estimula una cualquiera de las etapas de transcripción génica, traducción génica o expresión de una actividad proteica. Por otro lado, la expresión “un compuesto que disminuye el nivel de expresión de un gen”, como se usa en el presente documento, hace referencia a un compuesto que inhibe una cualquiera de estas etapas.

En aspectos concretos, el método de cribado de un agente terapéutico para una enfermedad relacionada con el cáncer de colon se puede llevar a cabo *in vivo* o *Vitro*. Este método de cribado se puede realizar mediante, por ejemplo, (1) administración de un compuesto candidato a un sujeto animal; (2) medir el nivel de expresión de uno o más genes marcadores en una muestra biológica del sujeto animal, o (3) seleccionar un compuesto que aumente o disminuya el nivel de expresión de uno o más genes marcadores en comparación con lo observado en un control con el que no se ha puesto en contacto el compuesto candidato

En otro aspecto más, en el presente documento se proporciona un método para evaluar la eficacia de un compuesto candidato para un agente farmacéutico a nivel de expresión de uno o más genes marcadores poniendo en contacto

un sujeto animal con el compuesto candidato y monitorizar el efecto del compuesto sobre el nivel de expresión del o los más genes marcadores en una muestra biológica derivada del sujeto animal. La variación del nivel de expresión del o los genes marcadores en una muestra biológica del sujeto animal se puede monitorizar usando la misma técnica que se usó en el método de análisis descrito anteriormente. Además, basándose en la evaluación, un compuesto candidato para un agente farmacéutico se puede seleccionar mediante cribado.

Todas las patentes, solicitudes de patente y referencias citadas en el presente documento se incorporan en su totalidad por referencia. Aunque los expertos en la materia han descrito e ilustrado con suficiente detalle la invención para prepararla y usarla, deberán ser evidentes diversas alternativas, modificaciones y mejoras sin desviarse del espíritu y alcance de la invención. Un experto en la materia aprecia fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener las finalidades y ventajas mencionadas, así como las inherentes en la misma.

Los métodos y reactivos descritos en el presente documento son representativos de las realizaciones preferidas, son ejemplos y no se pretende que sean limitaciones del alcance de la invención. Los expertos en la técnica conocerán modificaciones y otros usos. Estas modificaciones entran dentro del espíritu de la invención y se definen mediante el alcance de las reivindicaciones. También será evidente para el experto en la técnica que se pueden realizar varias sustituciones y modificaciones en la invención divulgada en el presente documento sin desviarse del alcance y el espíritu de la invención.

Debe entenderse que aunque la presente invención se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la materia pueden realizar modificaciones y variaciones de los conceptos divulgados en el presente documento y que dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

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

1. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, *et al.* Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon Oxford: IARC Press; 2000:104-19.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer Clin* 2007;57(1):43-66.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61 (5):759-67.
4. Goldman E, Fisher JL. Discrepancies in cancer mortality estimates. *Arch Med Res* 2006;37(4):548-51.
5. Rodriguez-Bigas MA, Hoff P, Crane CH. Carcinoma of the Colon and Rectum. In: Kufe DW, Bast RC, Hait WN, *et al.*, eds. *Holland-Frei Cancer Medicine* 7. 7th ed. Hamilton, Ont: BC Decker Inc; 2006:1369-91.
6. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6(11):857-66.
7. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, *et al.* A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353(17):1793-801.
8. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, *et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006;9(3):189-98.
9. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-97.
10. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843-54.
11. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75(5):855-62.
12. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 2003;113(0):25-36.
13. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65(14):6029-33.
14. Xu P, Vernooij SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA *Mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 2003;13(9):790-5.
15. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303(5654):83-6.
16. He L, Thomson JM, Hemann MT, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435(7043):828-33.
17. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(4):259-69.
18. Lu J, Getz G, Miska EA, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834-8.
19. Volinia S, Calin GA, Liu CG, *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 103(7):2257-61.
20. Cummins JM, He Y, Leary RJ, *et al.* The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(10):3687-92.
21. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, *et al.* Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNA differentially

expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006;5:29.

22. Michael MZ, SM OC, van Hoist Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003 (12):882-91.

23. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(24):15524-9.

24. Dews M, Homayouni A, Yu D, *et al.* Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 2006;38(9):1060-5.

25. Wang CL, Wang BB, Bartha G, *et al.* Activation of an oncogenic microRNA cistron by provirus integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(49):18680-4.

26. Georgantas RW, 3rd, Hildreth R, Morisot S, *et al.* CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(8):2730-5.

27. Chen Y, Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* 2007;67(3):976-83,

28. Wurdinger T, Costa FF. Molecular therapy in the microRNA era *Pharmacogenomics J* 2006.

29. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, *et al.* Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438(7068):685-9.

30. Liu CG, Calin GA, Meloon B, *et al.* An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(26):9740-4.

31. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2005;48(6):11618.

32. Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 2004;339(2):327-35.

33. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, *et al.* A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005;65(21):962832.

34. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65(16):7065-70.

35. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007;26(19):2799-803.

36. Meng F, Henson R, Lang M, *et al.* Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006;130(7):2113-29.

37. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 Targets the Tumor Suppressor Gene Tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007;282(19):14328-36.

38. Brosens LA, van Hattem WA, Jansen M, de Leng WW, Giardiello FM, Offerhaus GJ. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Curr Mol Med* 2007;7(1):29-46.

39. Mattes J, Yang M, Foster PS. Regulation of microRNA by antagomirs: a new class of pharmacological antagonists for the specific regulation of gene function? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(1):8-12.

## **REFERENCIAS PARA EL EJEMPLO 2**

1. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2006.

2. Bartel, D. P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. 116(2): p. 281-97.

3. Esquela-Kerscher, A. y F.J. Slack, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(4): p. 259-69.

4. Brennecke, J., D.R. Hipfner, A. Stark, R.B. Russell, y S.M. Cohen, bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 2003. 113(1): p. 25-36.

5. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, y K.S. Kosik. MicroRNAs-21 is an antiapoptotic, factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 6029-33.

6. Xu, P., S.Y. Vernooy, M. Guo, y B.A. Hay, The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal/at metabolism. *Curr Biol*, 2003. 13(9): p. 790-5.

7. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, y V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 1993, 75(5): p. 843-54.

8. Wightman, B., I. Ha, y G. Ruvkun, Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993. 75(5): p. 855-62.

9. Chen, C.Z., L. Li, H.F. Lodish, y D.P. Bartel, Micro-RNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004. 303(5654): p. 83-6.

10. He, L., J.M. Thomson, M.T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G.J. Hannon, y S.M. Hammond, A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005 435(7043): p. 828-33.

11. Lu, J., G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R. Horvitz, y T.R. Golub, MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005 435(7043): p. 834-8.

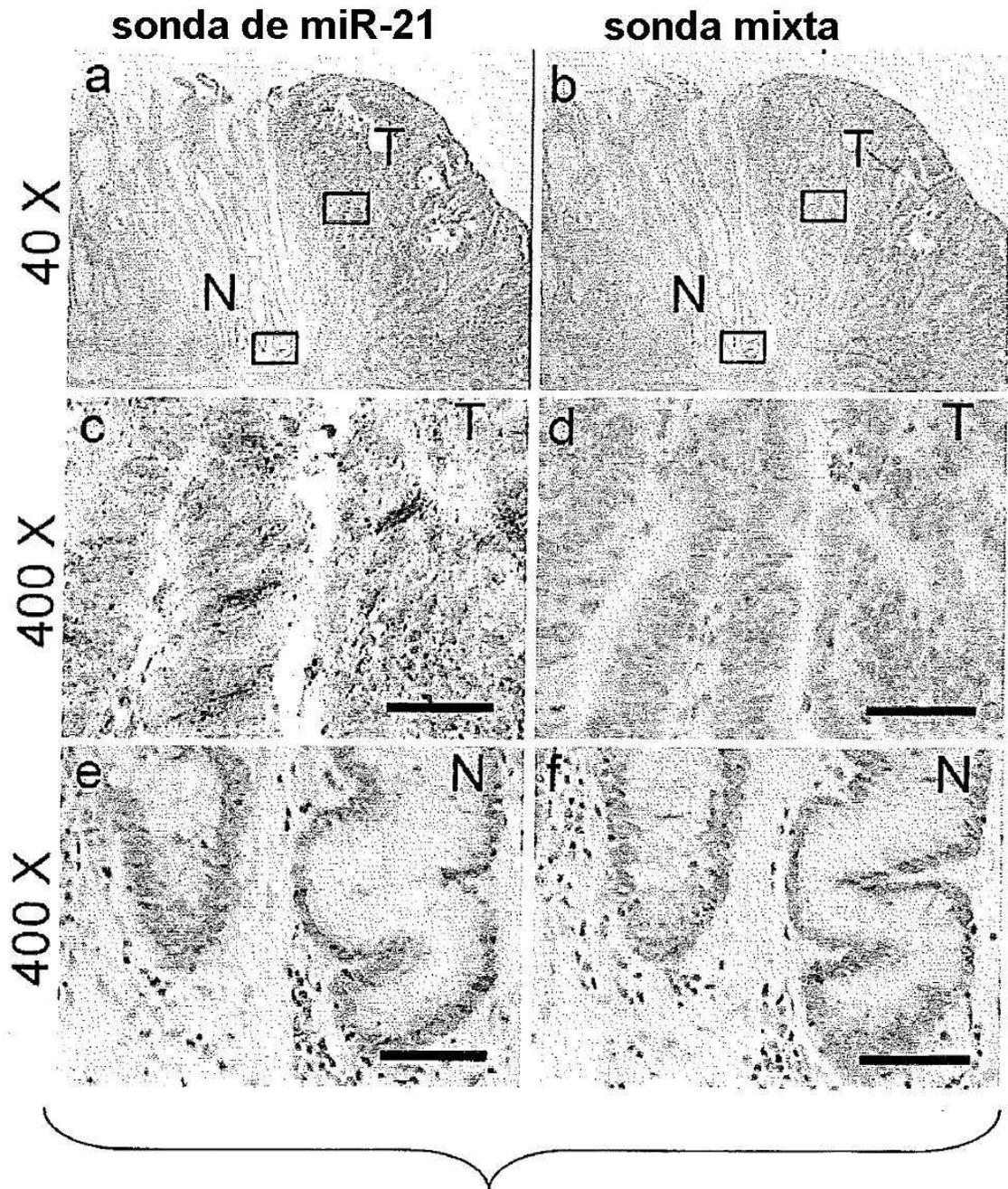
12. Volinia, S., G.A. Calin, C.G. Liu, S. Arabs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R.L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C.C. Harris, y C.M. Croce, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(7): p. 2257-61.

13. Cummins, J.M., Y. He, R.J. Leary, R. Pagliarini, L.A. Diaz, Jr., T. Sjoblom, O. Barad, Z. Bentwich, A.E. Szafranska, E. Labourier, C.K. Raymond, B.S. Roberts, H. Juhl, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, y V.E. Volculescu,

- The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(10): p. 3687-92.
14. Cahn, G.A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S.E. Wojcik, M.V. Iorio, R. Visone, N.I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini, y C.M. Croce, A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2005 353(17): p. 1793-801,
- 5 15. Yanaihara, N., N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R.M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G.A. Calin, C.G. Liu, C.M. Croce, y C.C. Harris, Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006. 9(3): p. 189-98.
- 10 16. Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K.G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, y M. Stoffel, Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature*, 2005, 438(7068): p. 685-9.
17. Liu, C.G., G.A. Calin, B. Meloon, N. Gamliel, C. Sevignani, M. Ferracin, C.D. Dumitru, M. Shimizu, S. Zupo, M. Dono, H. Alder, F. Bullrich, M. Negrini, y C.M. Croce, An oligonucleotide microchip, for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(26): p. 9740-4.
- 15 18. Iorio, M.V., M. Ferracin, C.G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J.P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G.A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, y C.M. Croce, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(16): p. 7065-70.
19. Cheng, A.M., M.W. Byrom, J. Shelton, y L.P. Ford, Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(4): p. 1290-7.
- 20 20. Tanzer, A. y P.F. Stadler, Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol*, 2004 339(2): p. 327-35.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar un mal pronóstico en pacientes con adenocarcinoma de colon en estadio III que están recibiendo o han recibido quimioterapia basada en fluorouracilo, que comprende:
- 5           medir el nivel de al menos un producto génico de miR-21 en una muestra de ensayo de un paciente con adenocarcinoma de colon,  
determinar un mal pronóstico en el paciente con adenocarcinoma de colon cuando hay incremento en al menos el nivel del producto génico de miR-21 en la muestra de ensayo con respecto al nivel de un correspondiente  
10           producto génico de miR-21 en una muestra control.
2. Un método de diagnóstico *in vitro* de la presencia de adenocarcinoma de colon en estadio III en un paciente con adenocarcinoma de colon, que comprende:
- 15           determinar un nivel de expresión de al menos un marcador en una muestra de un paciente que tiene adenocarcinoma de colon; incluyendo el al menos un marcador al menos un producto génico de miR-21;  
comparar el nivel de expresión determinado en la etapa (1) con un nivel de expresión de control del marcador en una muestra de un sujeto que no tiene adenocarcinoma de colon; y  
20           juzgar que el paciente tiene adenocarcinoma de colon en estadio III cuando el resultado de la comparación en la etapa (2) indica que: el nivel de expresión del al menos miR-21 en el sujeto de ensayo es mayor que en el control.
3. Un método de diagnóstico de si un sujeto tiene una respuesta mala a la quimioterapia adyuvante en un paciente con adenocarcinoma de colon en estadio III, que comprende:
- 25           transcripción inversa de ARN desde una muestra de ensayo obtenida de un paciente con adenocarcinoma para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana;  
hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende sondas oligonucleotídicas específicas de miRNA-21 para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y  
30           comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control, en donde un incremento en la señal del miR-21 es indicativo de que el sujeto tiene una mala respuesta a la quimioterapia adyuvante en el paciente con adenocarcinoma de colon.
4. Un método de la reivindicación 1, en el que la muestra es un tejido asociado a cáncer de colon.
- 35           5. Un método de la reivindicación 1, en el que la quimioterapia se selecciona de: 5-fluorouracilo; tegafur con uracilo; fármaco de fluorouracilo; fármaco de fluorouracilo-régimen de levamisol; y fármaco de fluorouracilo-régimen de leucovorina.
- 40           6. Un método de la reivindicación 3, en el que la quimioterapia se selecciona de: 5-fluorouracilo; tegafur con uracilo; fármaco de fluorouracilo; fármaco de fluorouracilo-régimen de levamisol; y fármaco de fluorouracilo-régimen de leucovorina.



**Figuras 1a-1f**

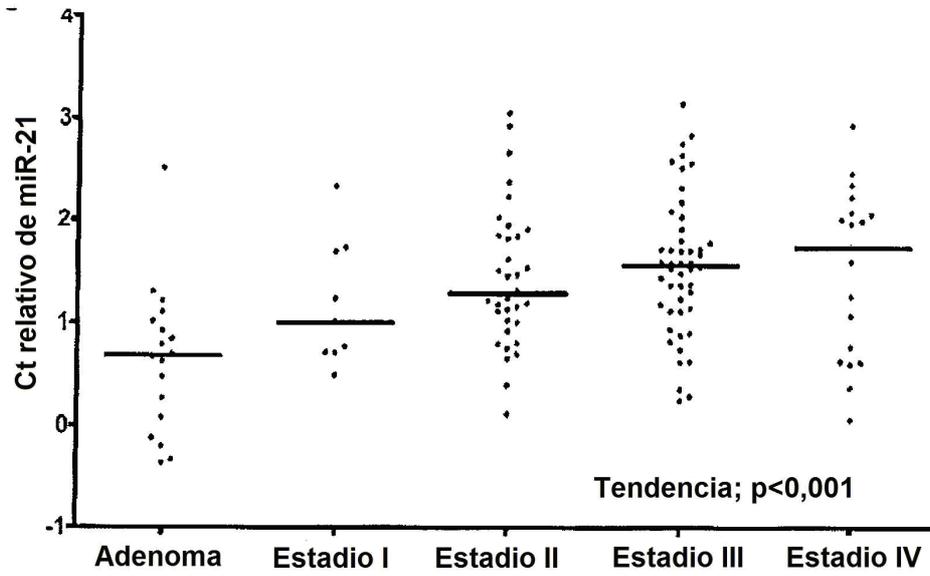


Figura 1g

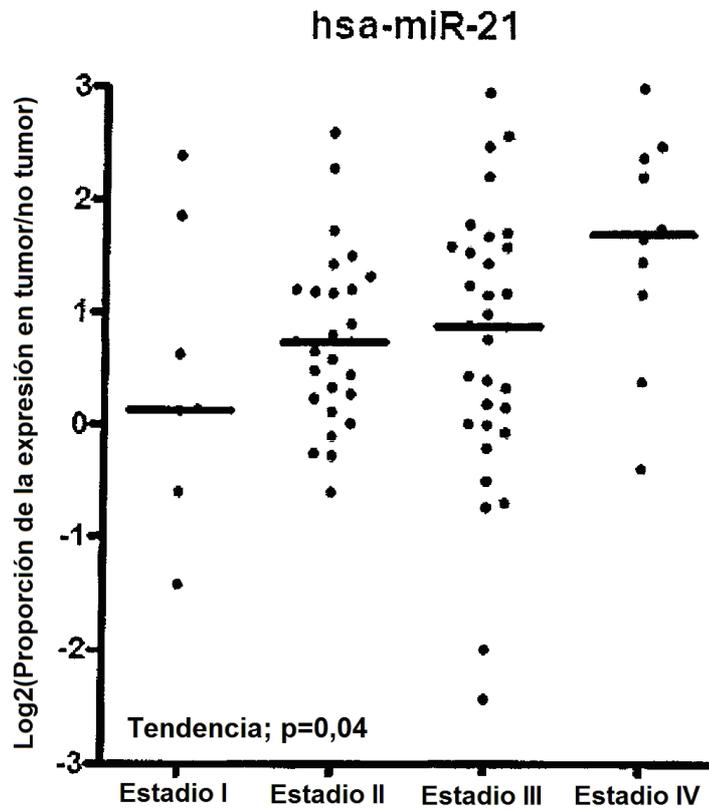


Figura 2

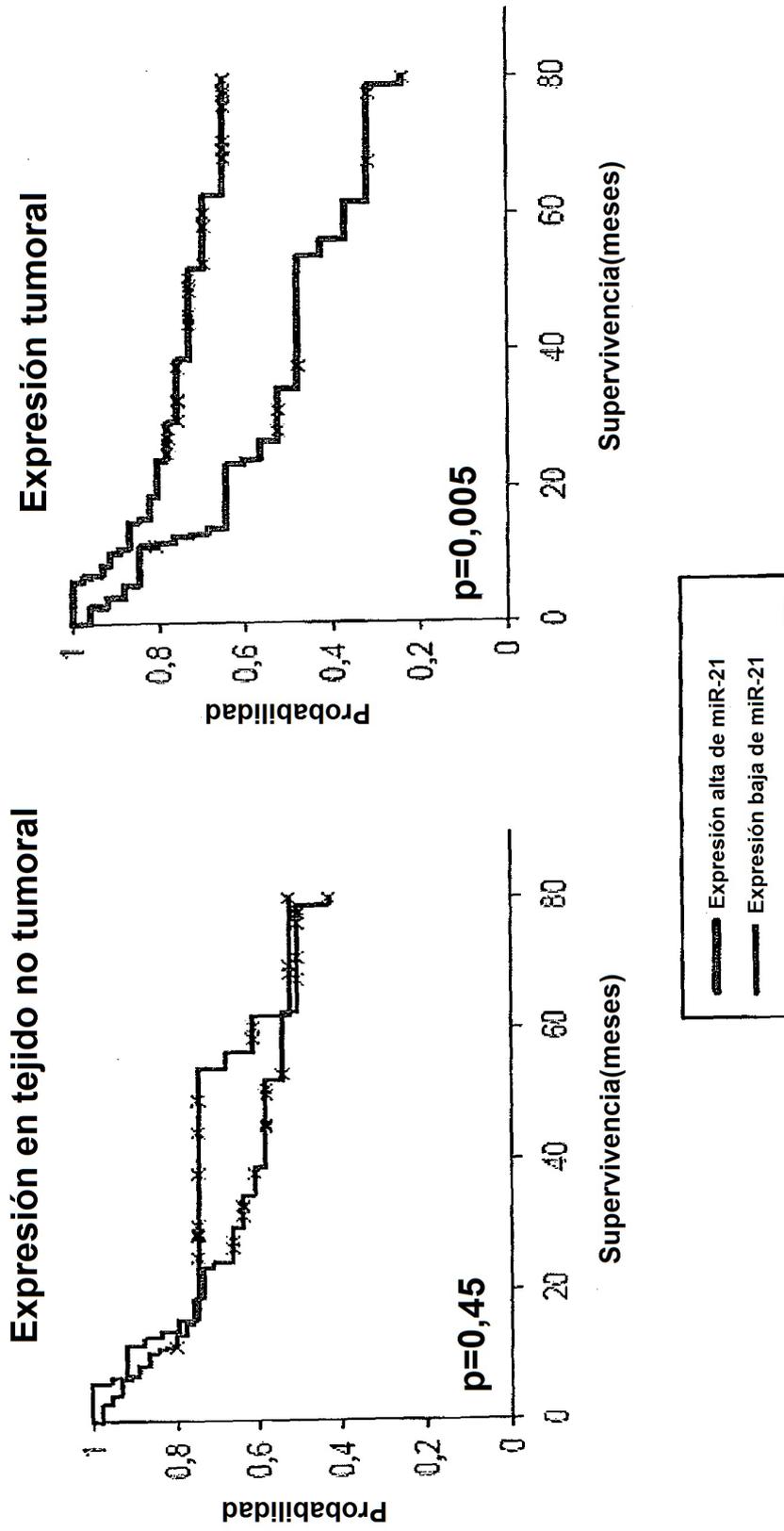
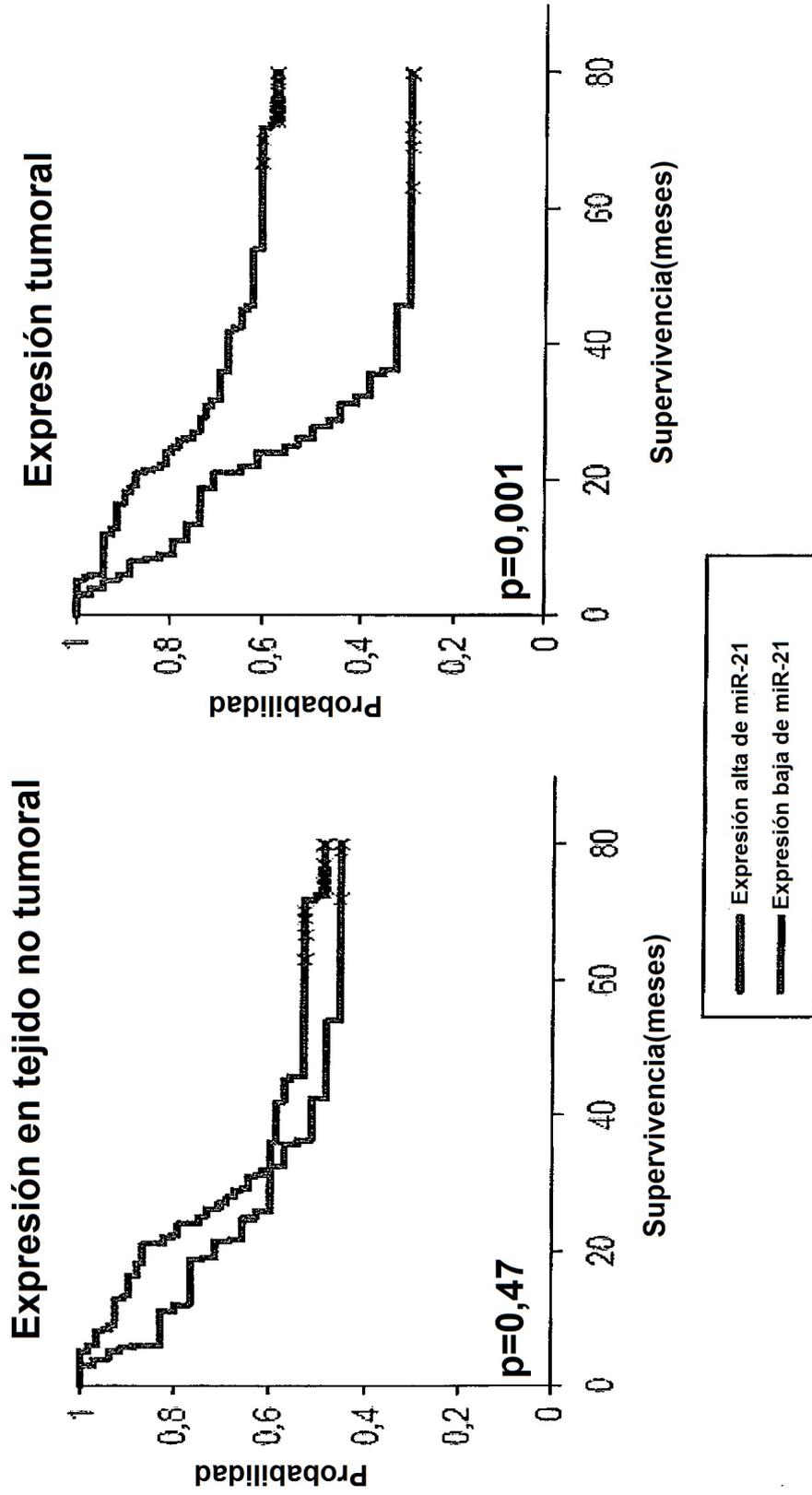


Figura 3a



**Figura 3b**

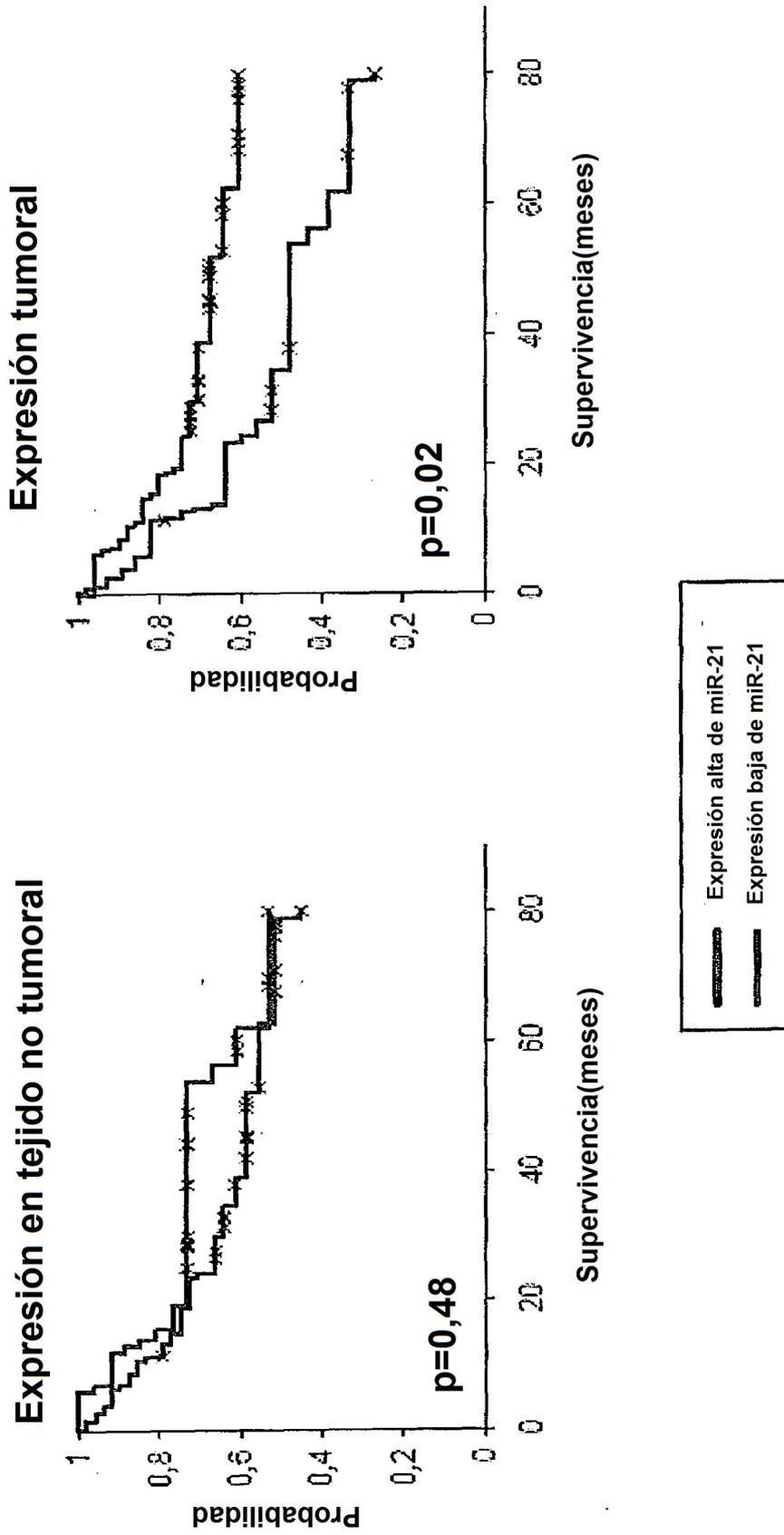


Figura 4a

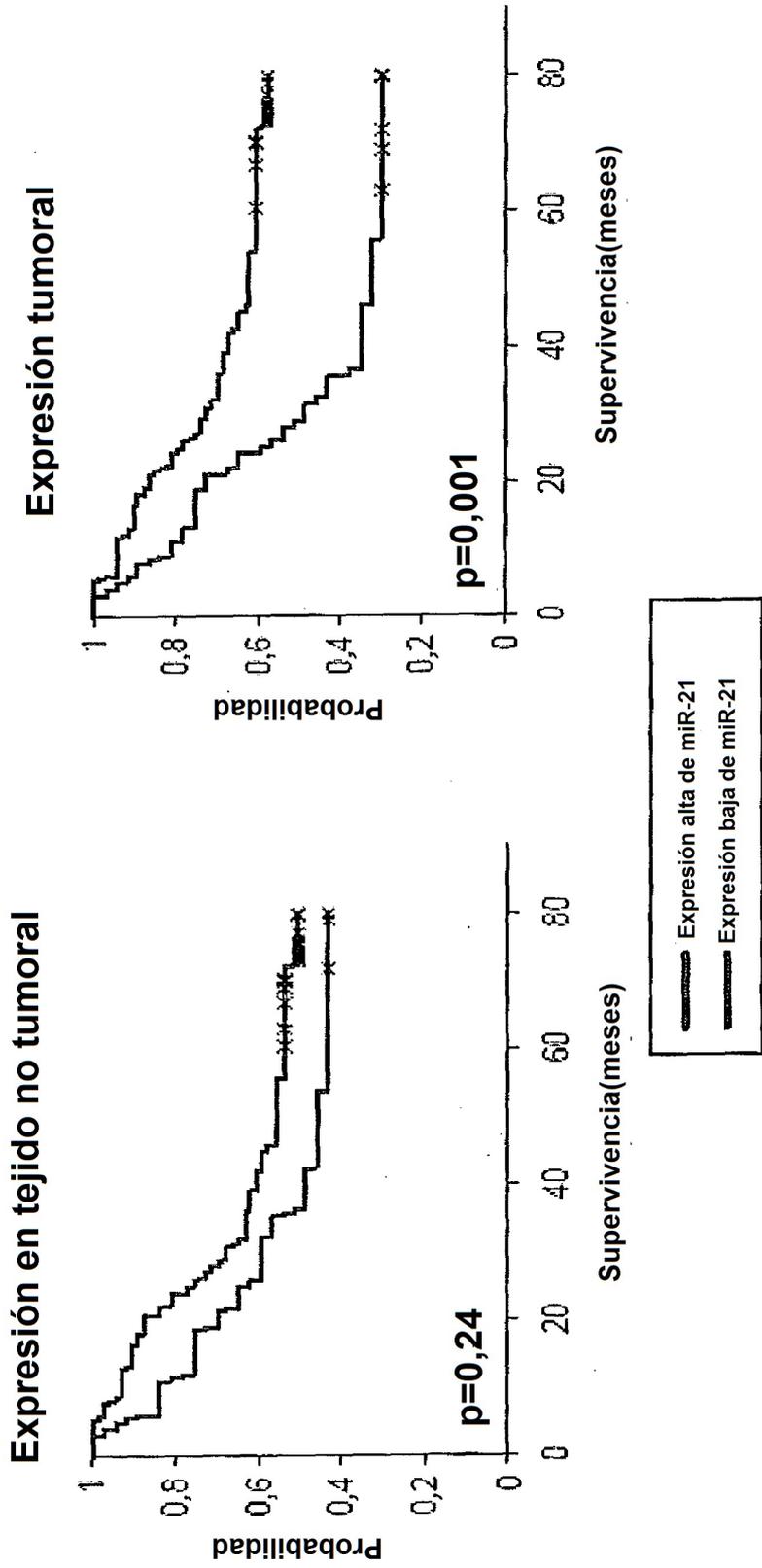
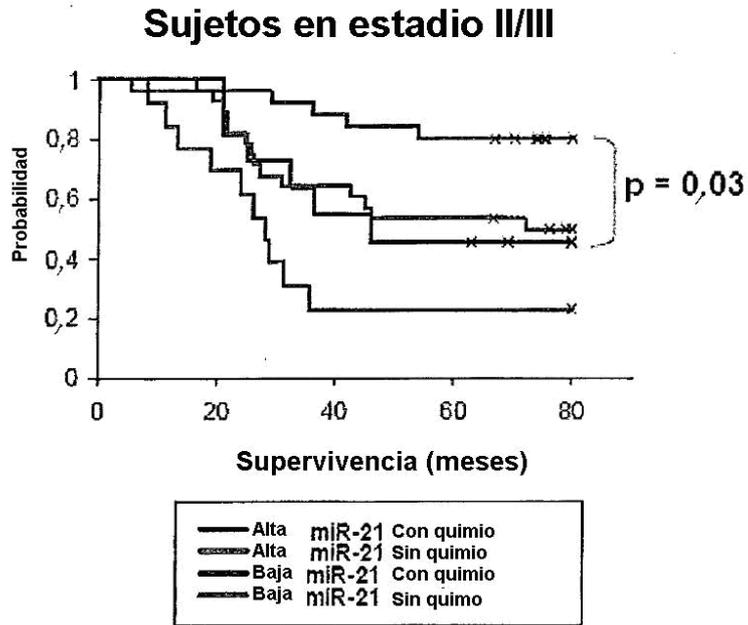
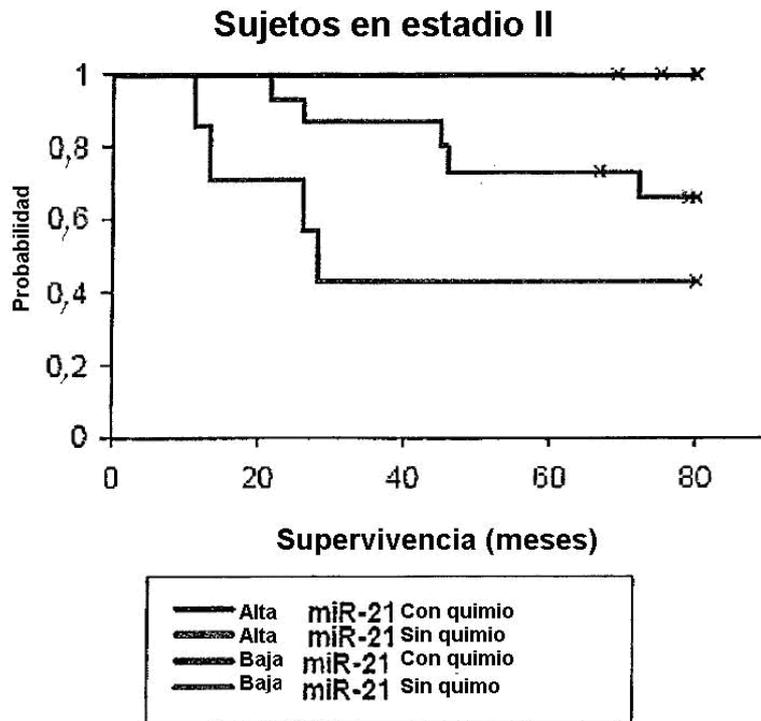


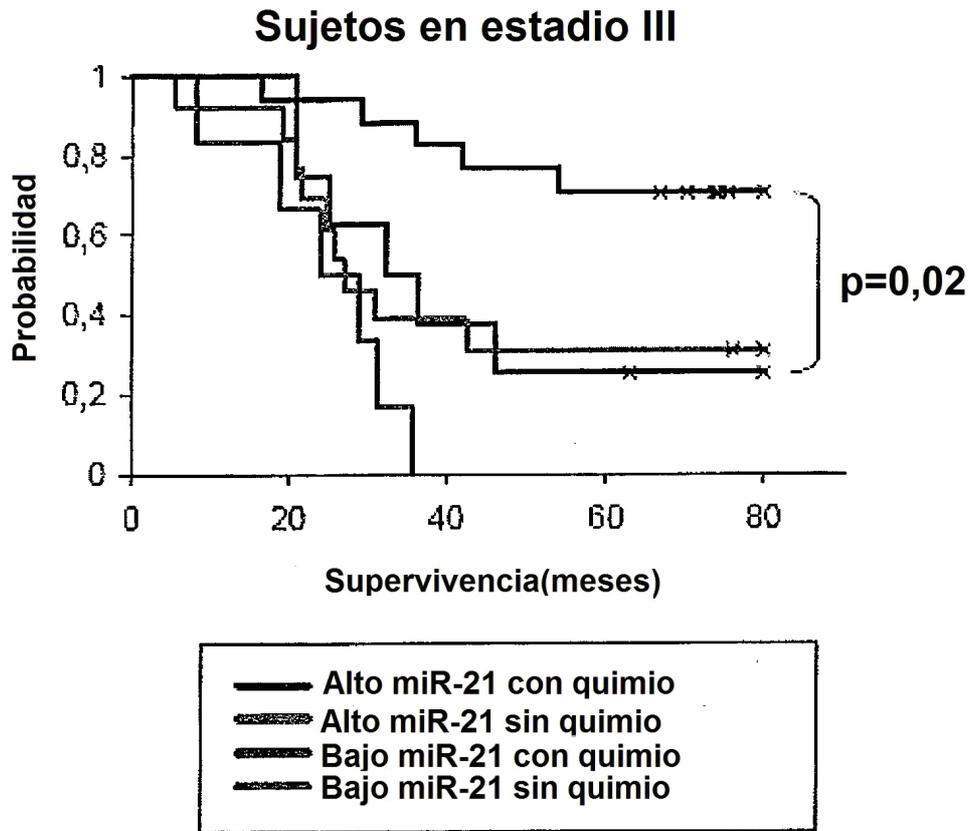
Figura 4b



**Figura 5a**



**Figura 5b**



**Figura 5c**

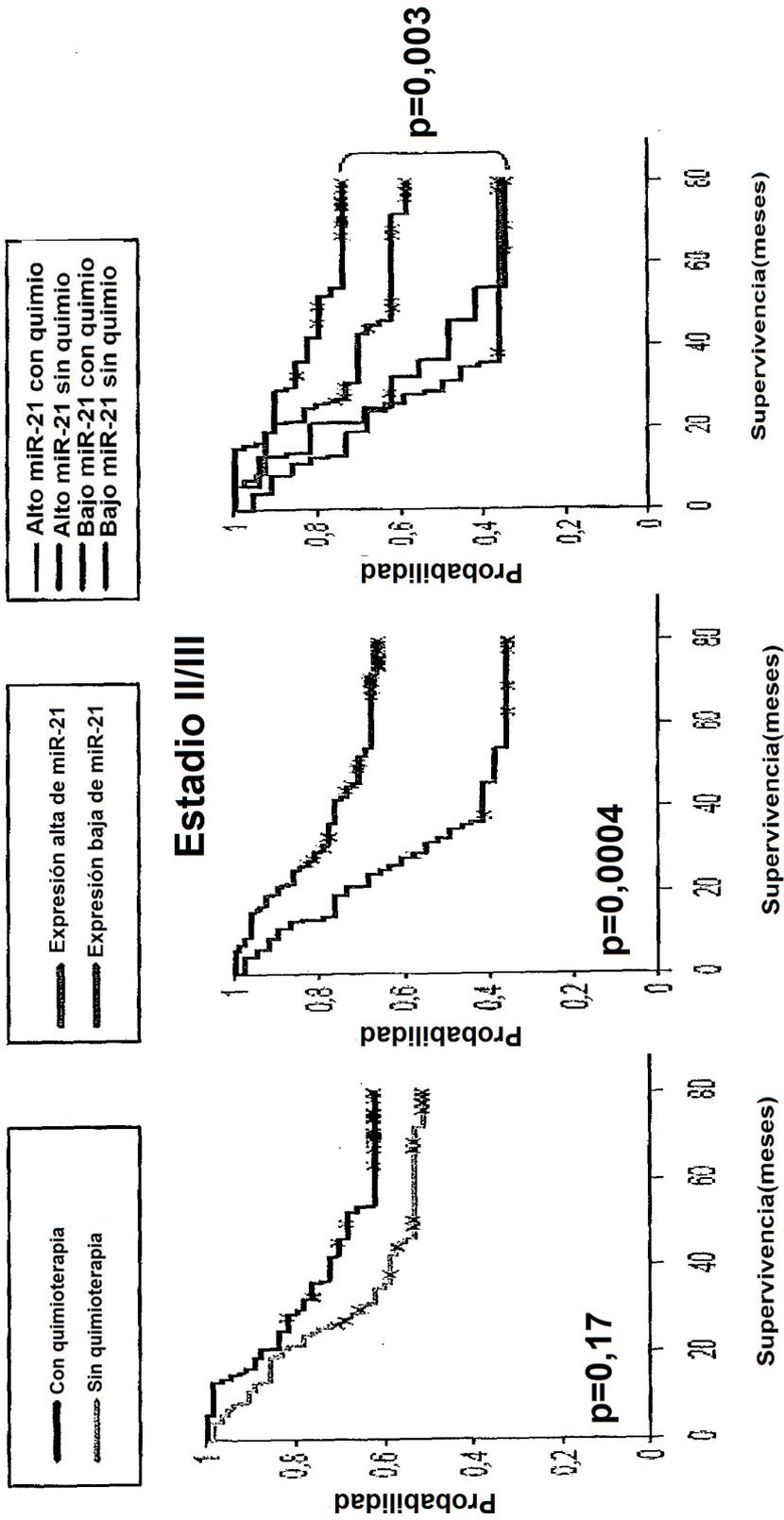


Figura 6a

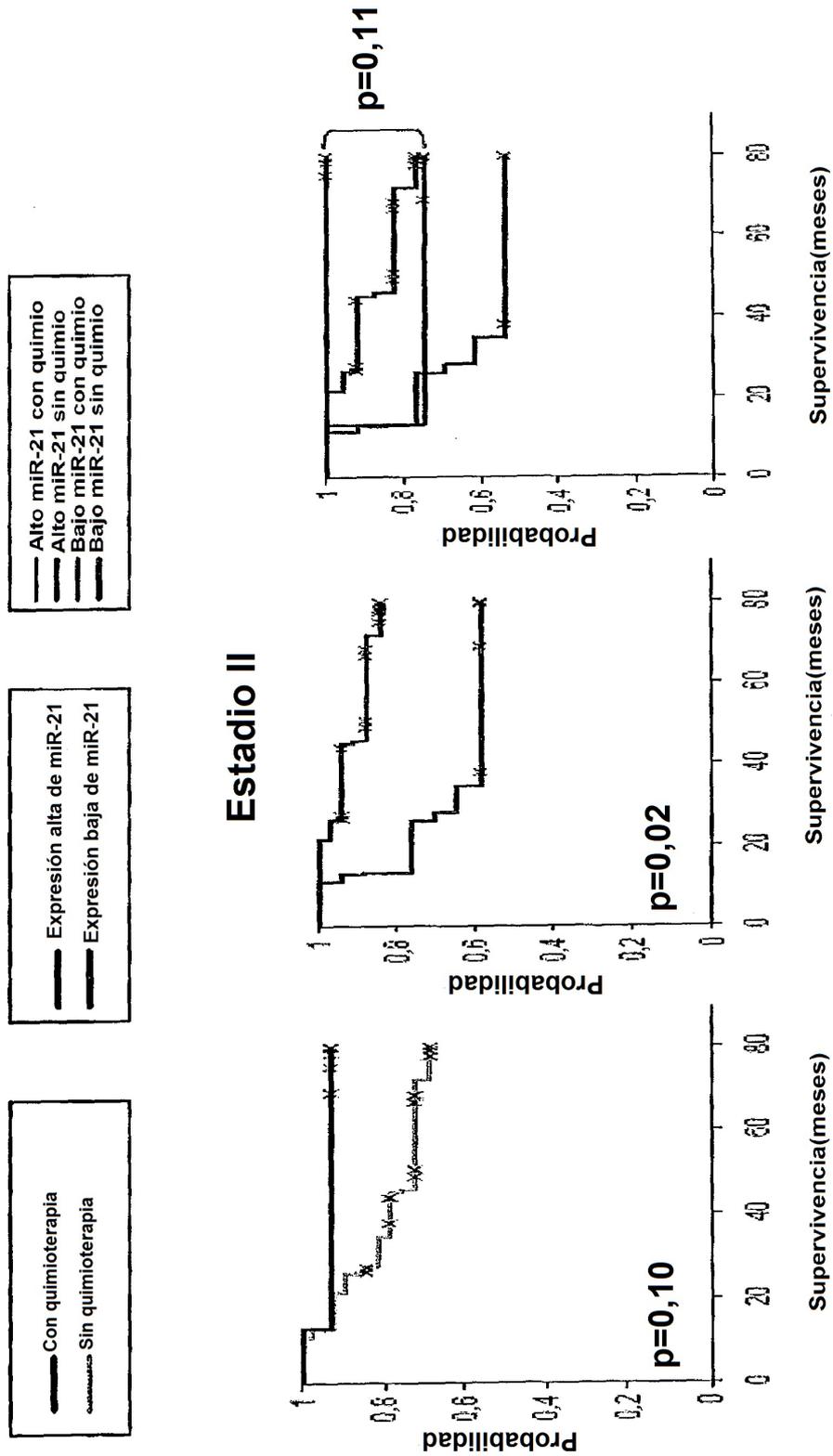


Figura 6b

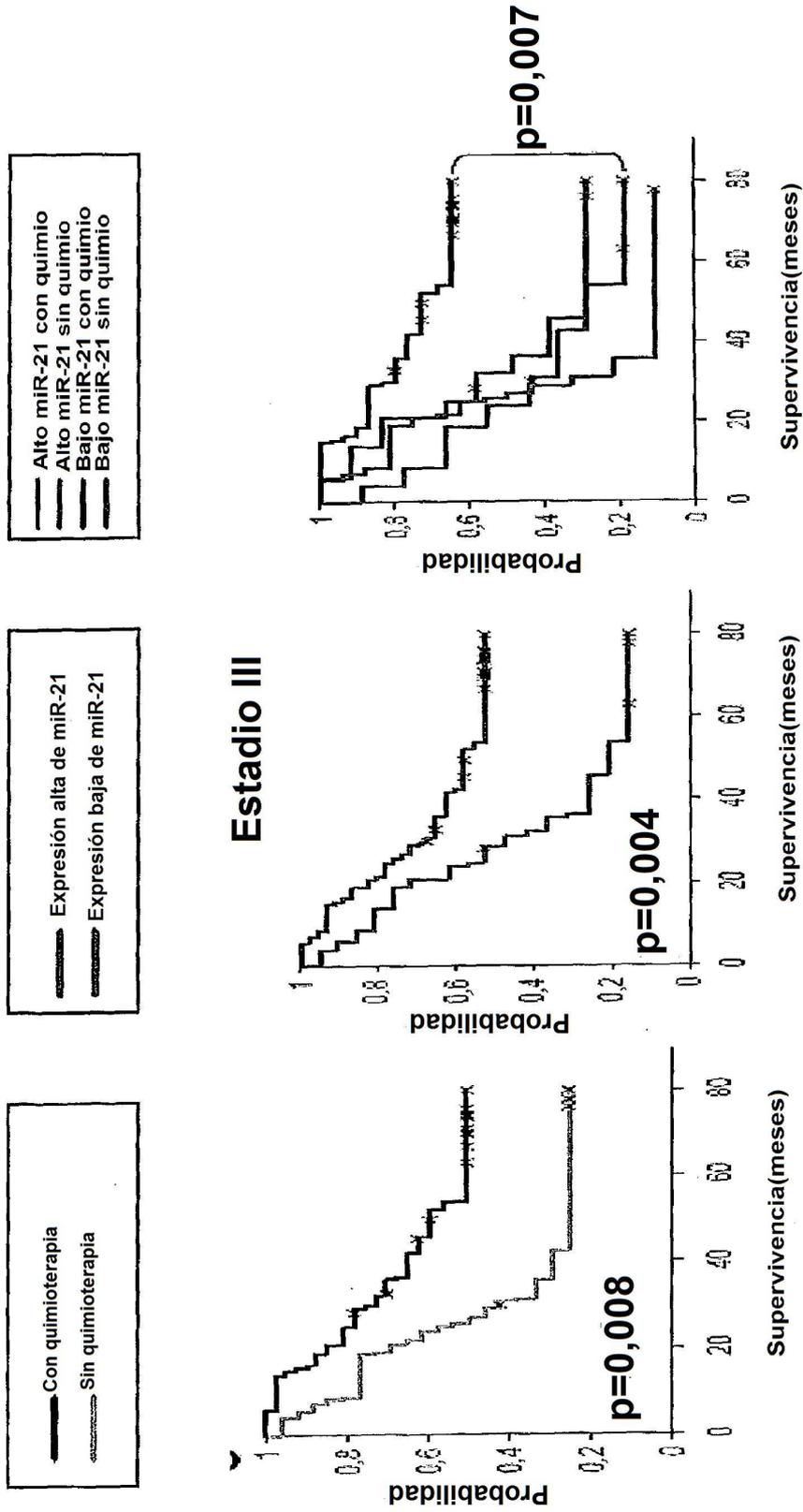
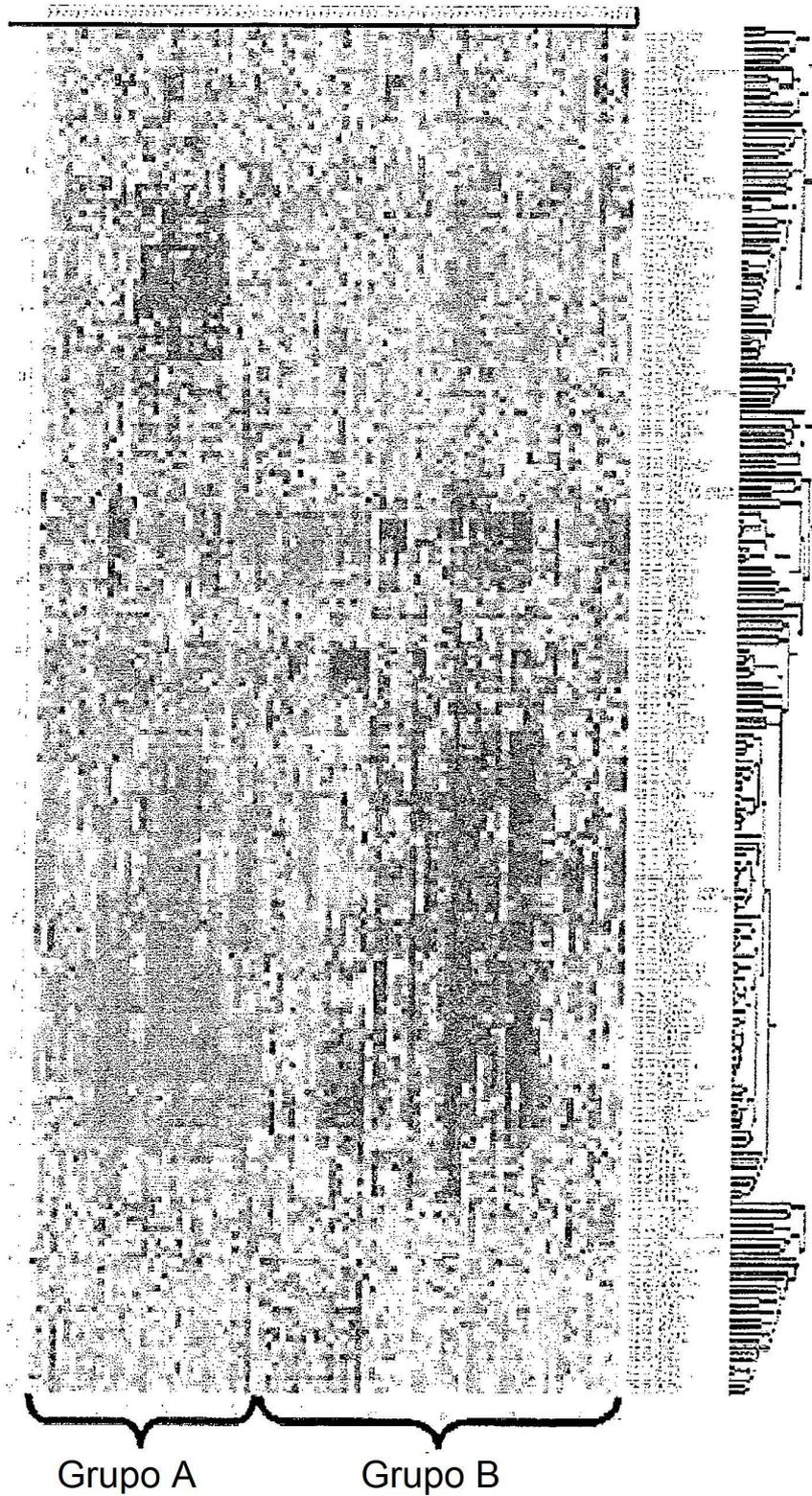


Figura 6c



Grupo A

Grupo B

**Figura 7a**

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

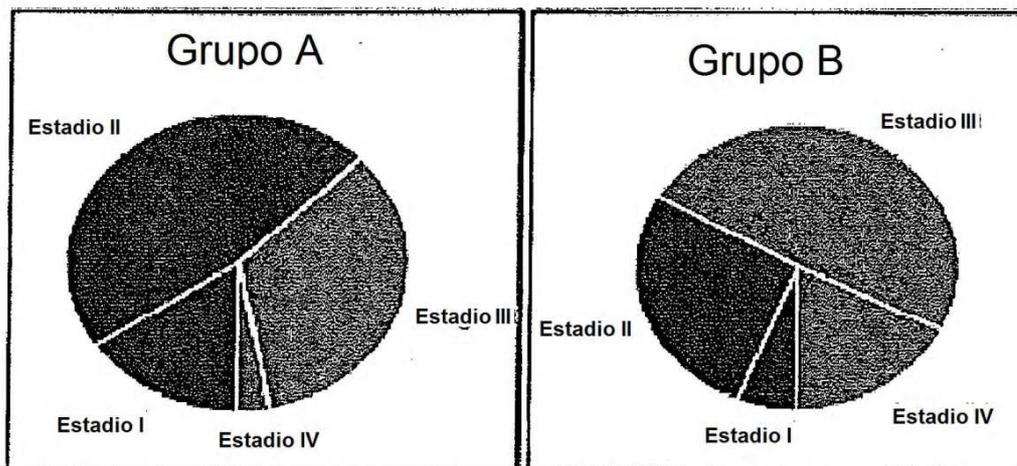


Figura 7b

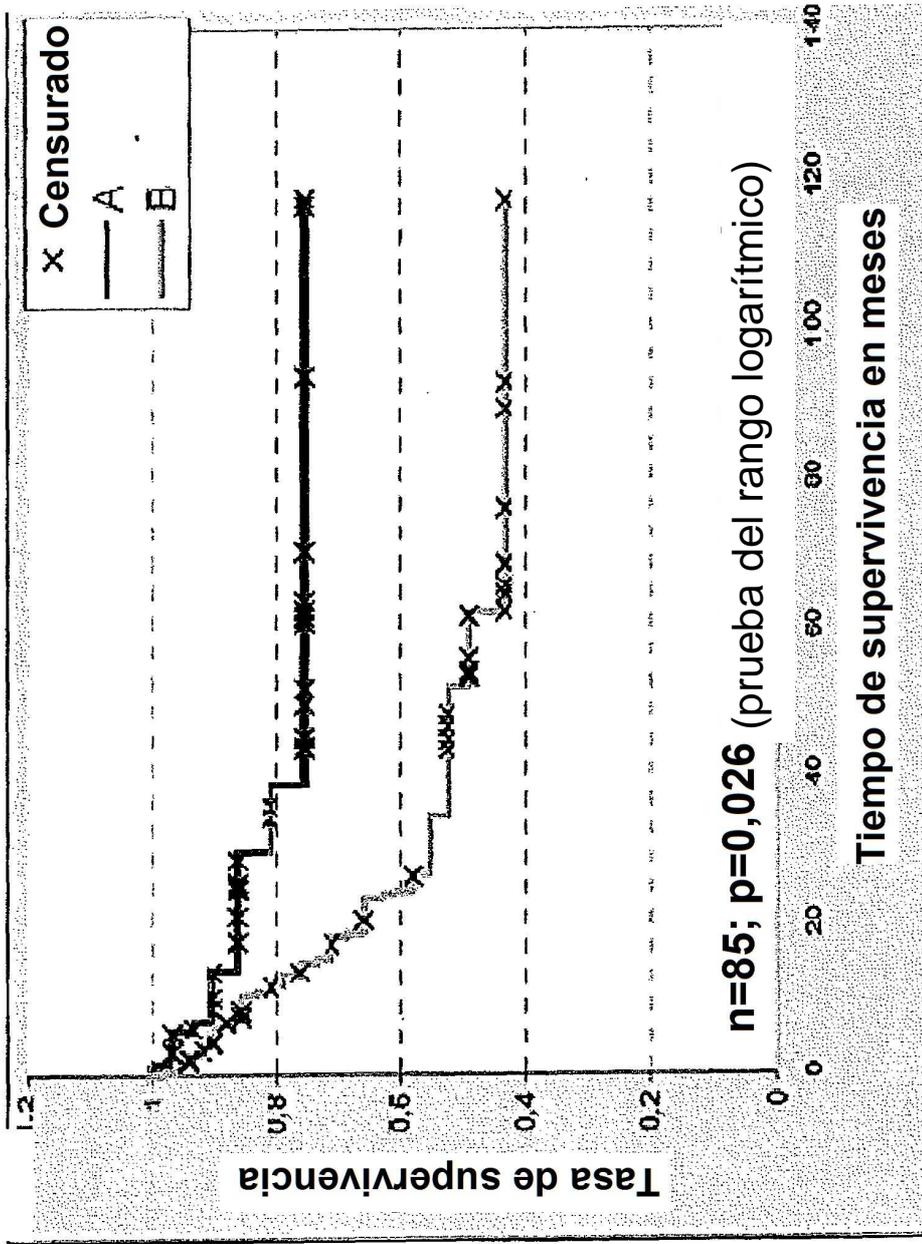
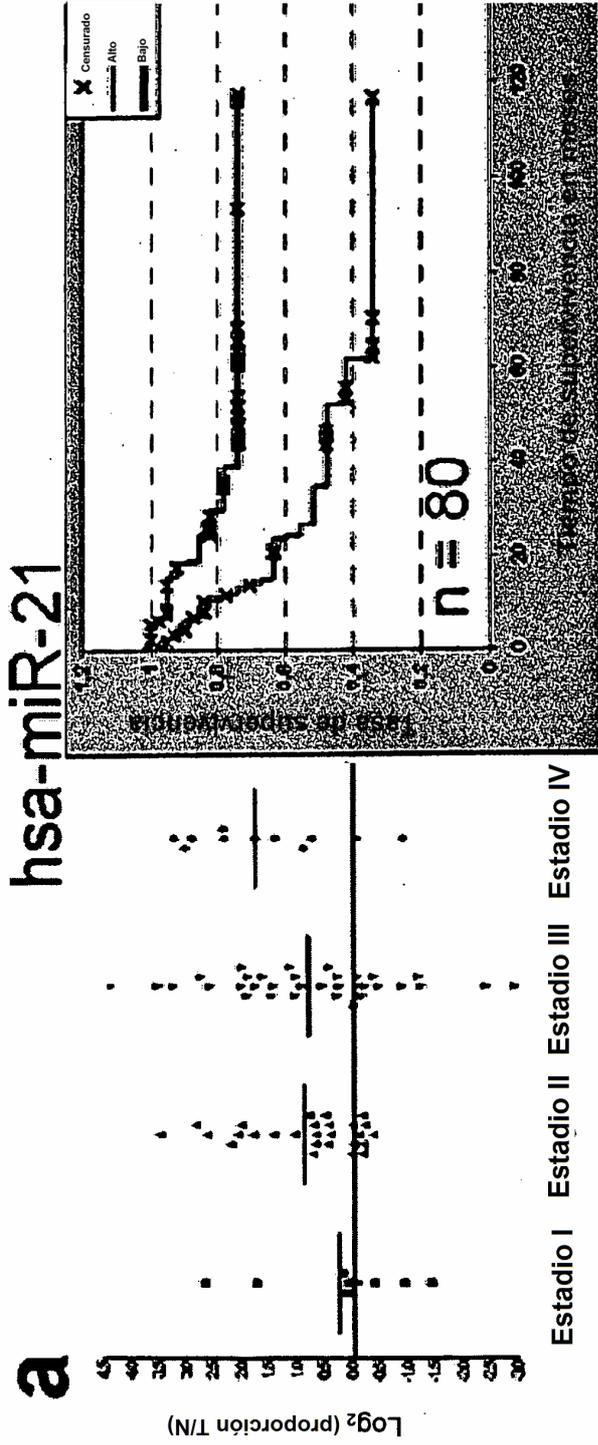
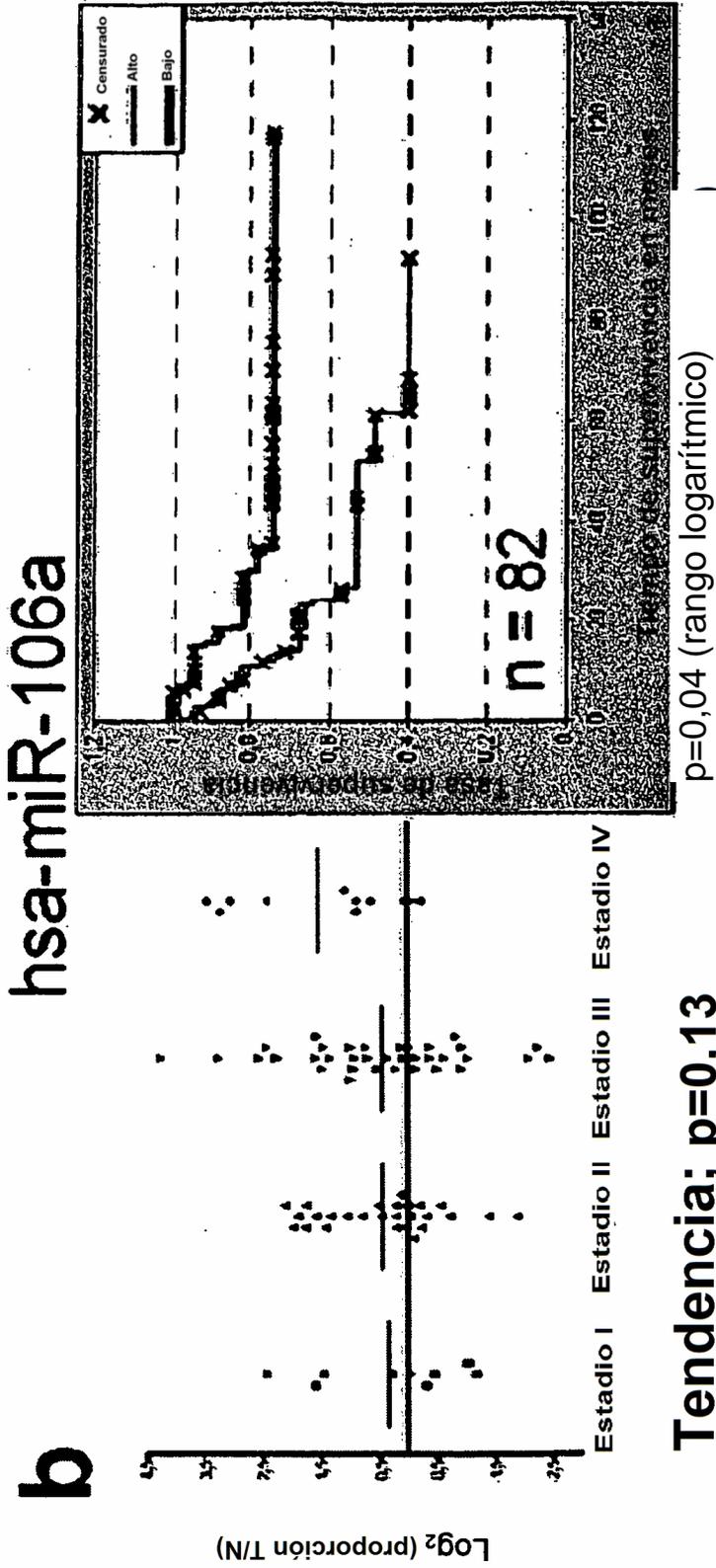


Figura 7c



Mediana pasaca en expresion aita

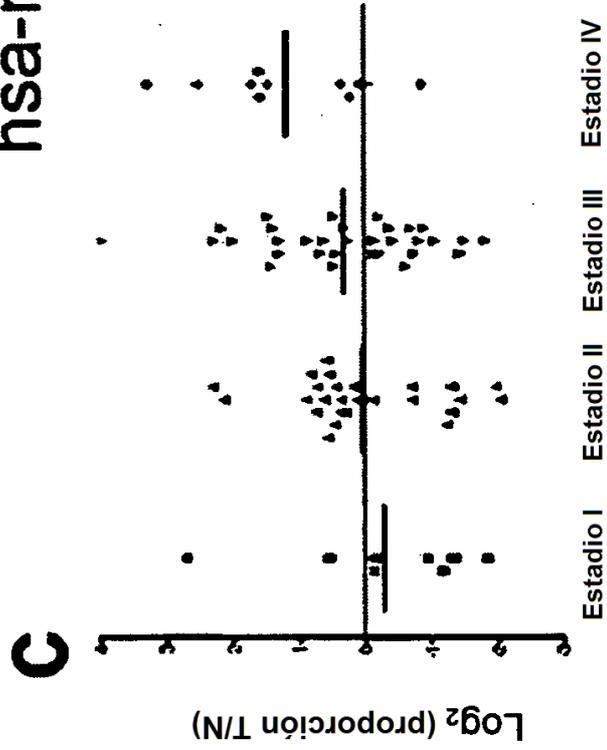
Figura 8a



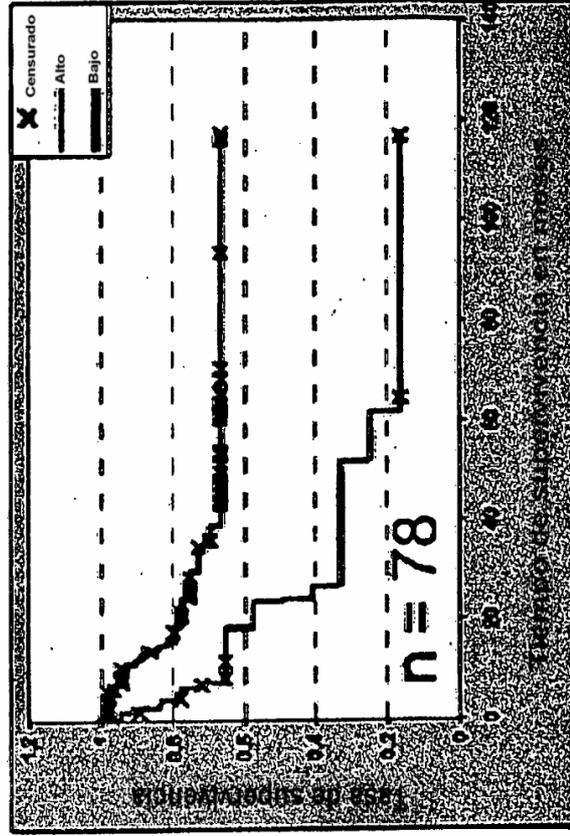
**Mediana basada en expresión alta**

**Figura 8b**

# hsa-miR-181b



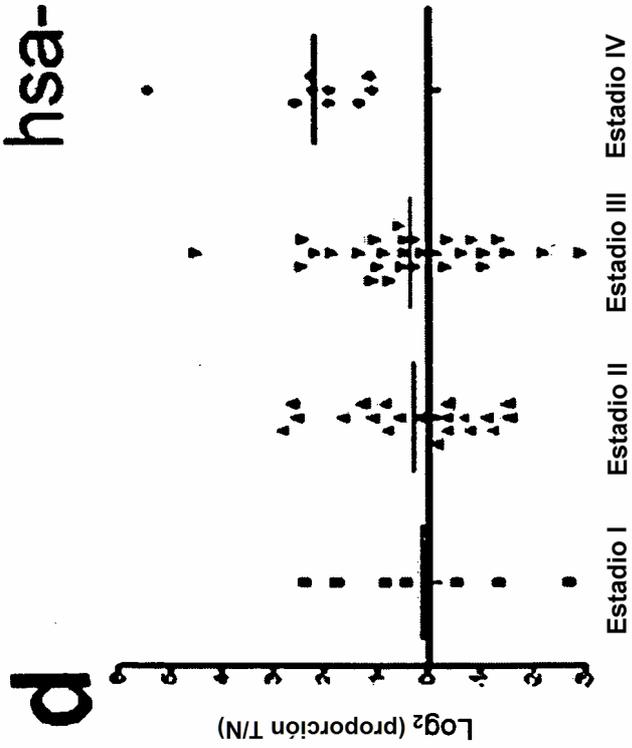
**Tendencia; p=0,016**



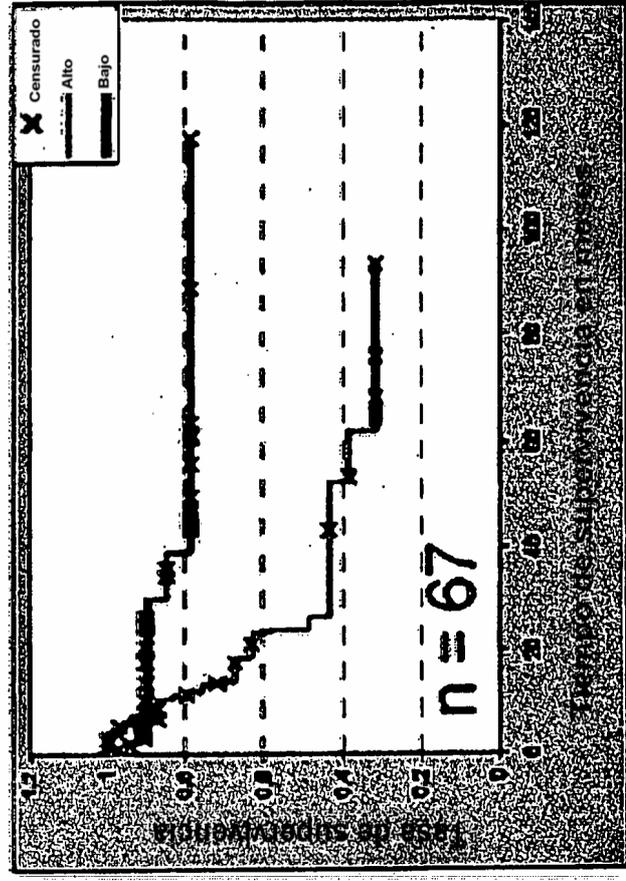
**Alta basada en el cuartil más alto**

**Figura 8c**

# hsa-miR-203



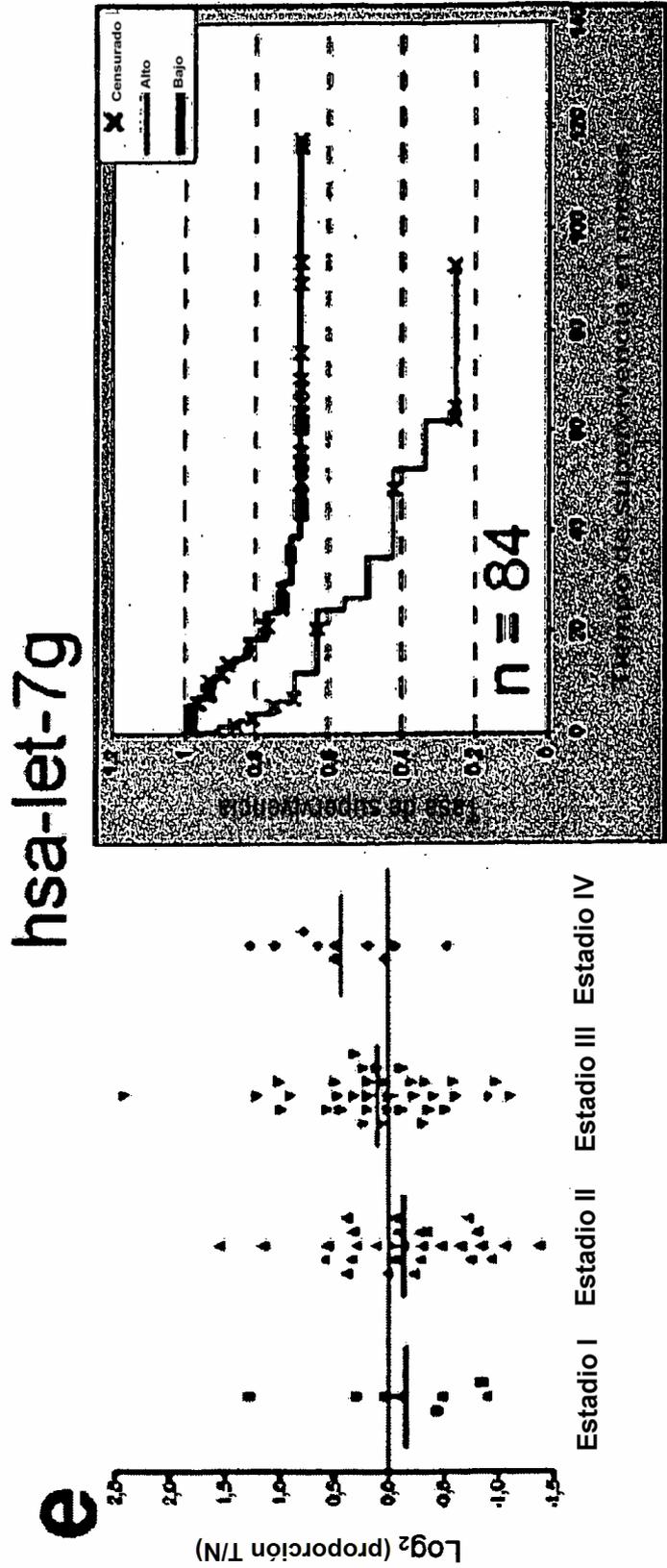
**Tendencia; p=0,016**



**p=0,04 (rango logarítmico)**

**Mediana basada en expresión alta**

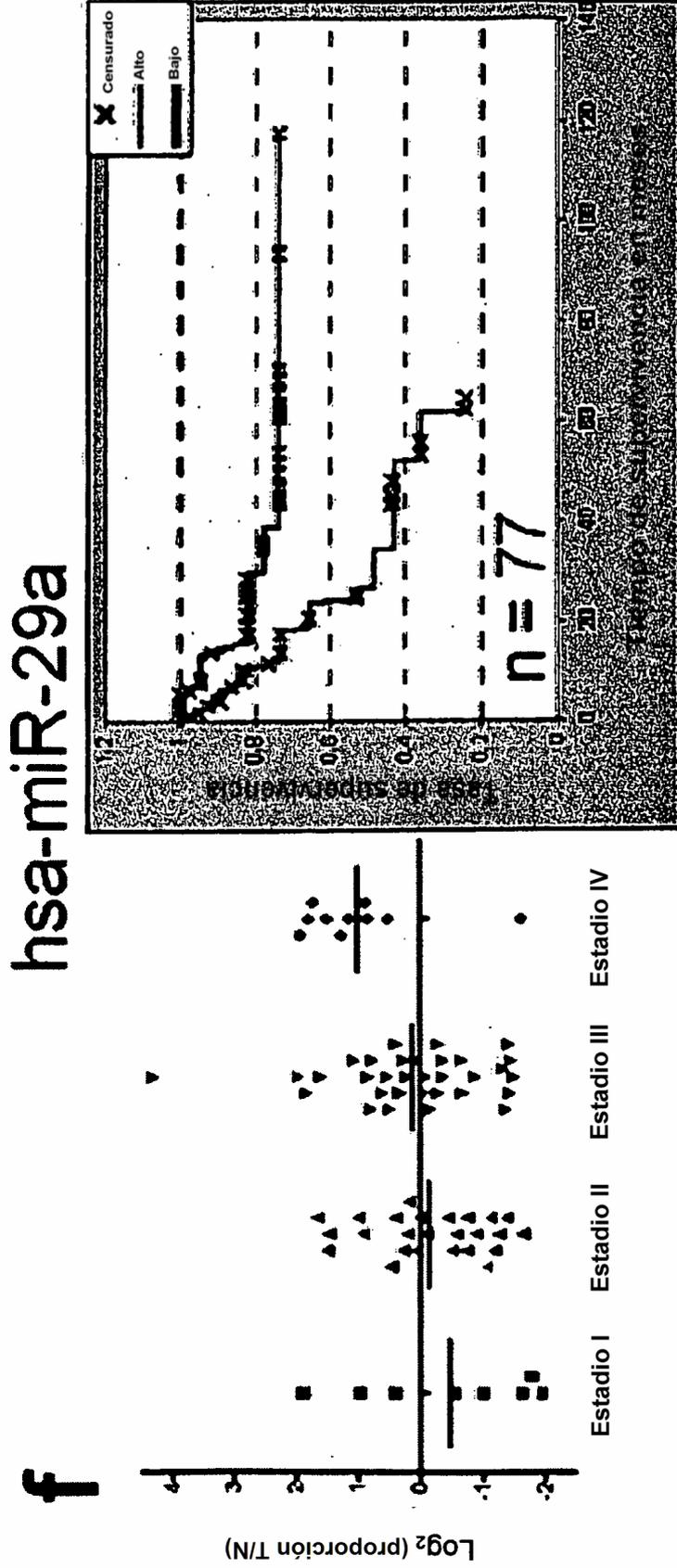
**Figura 8d**



p=0,04 (rango logarítmico)

Alta basada en el cuartil más alto

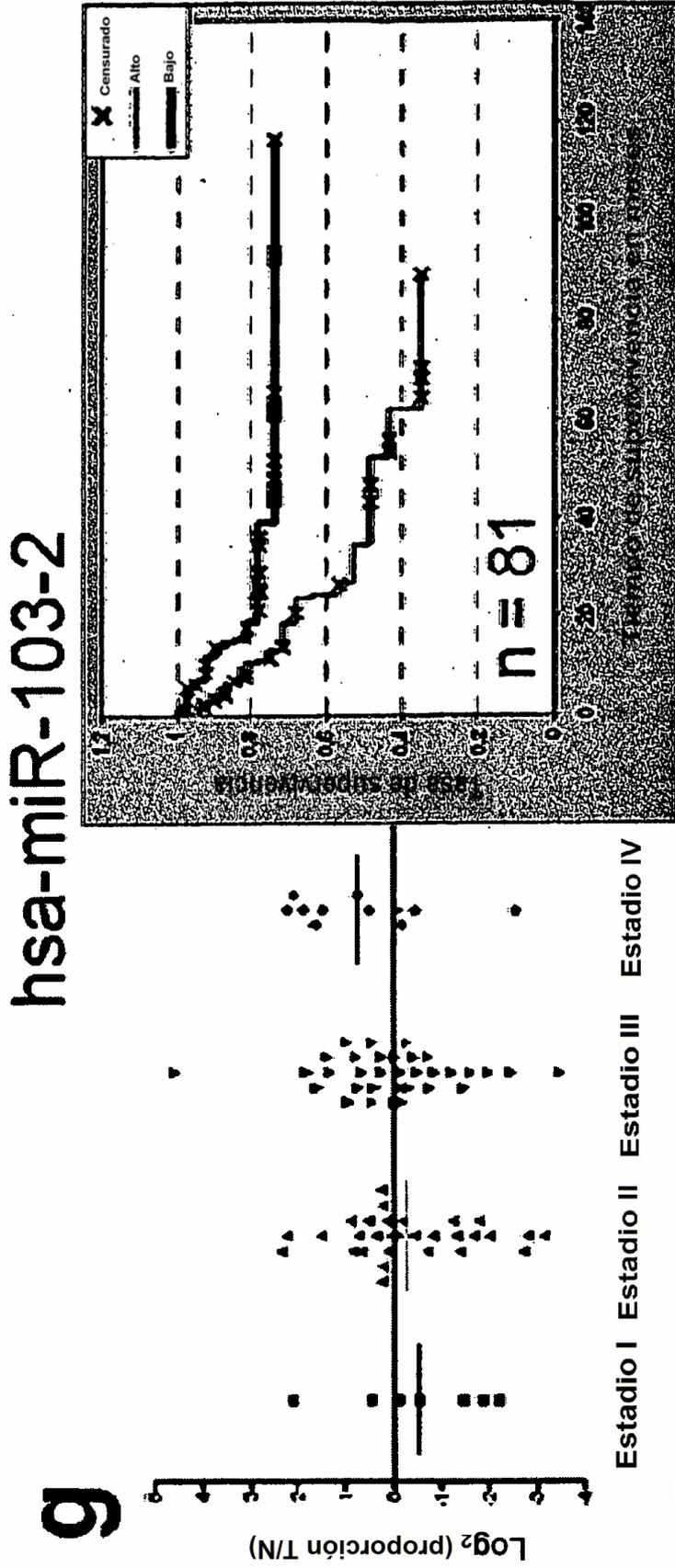
Figura 8e



**Tendencia; p=0,005**

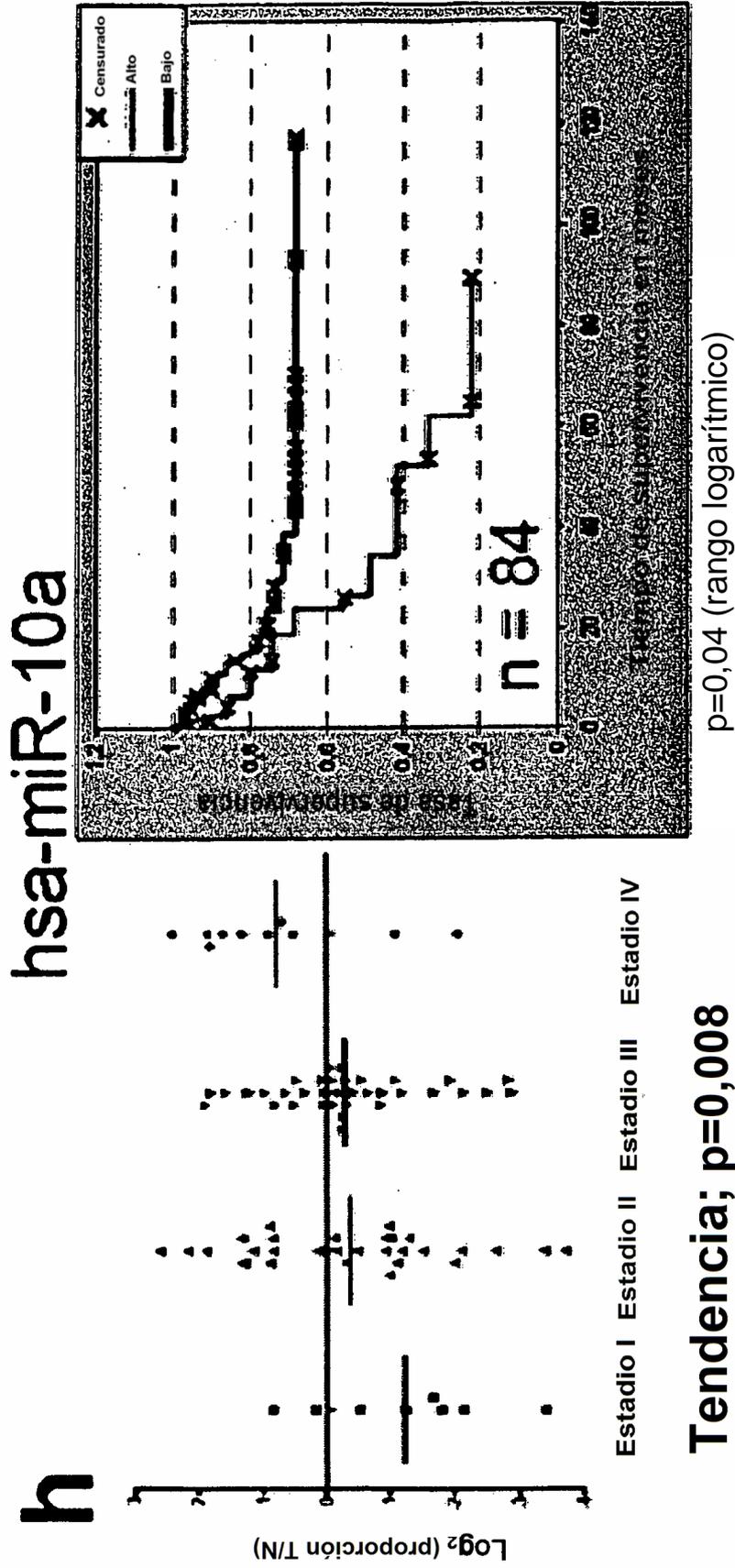
**Mediana basada en expresión alta**

**Figura 8f**



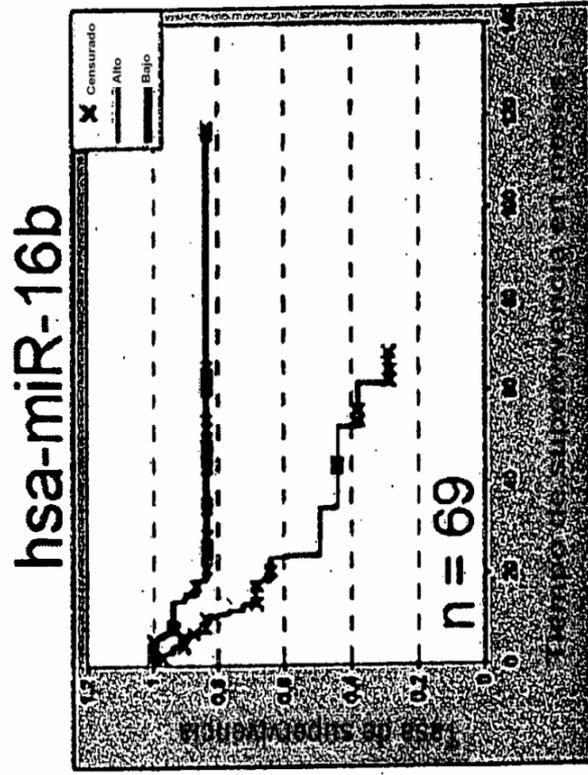
Mediana basada en expresión alta

Figura 8g



Alta basada en el cuartil más alto

Figura 8h



p=0,04 (rango logarítmico)

Mediana basada en expresión alta



Tendencia; p=0,048

Figura 8i

Dendrograma para experimentos de agrupamiento,  
usando distancia euclídea y enlace completo

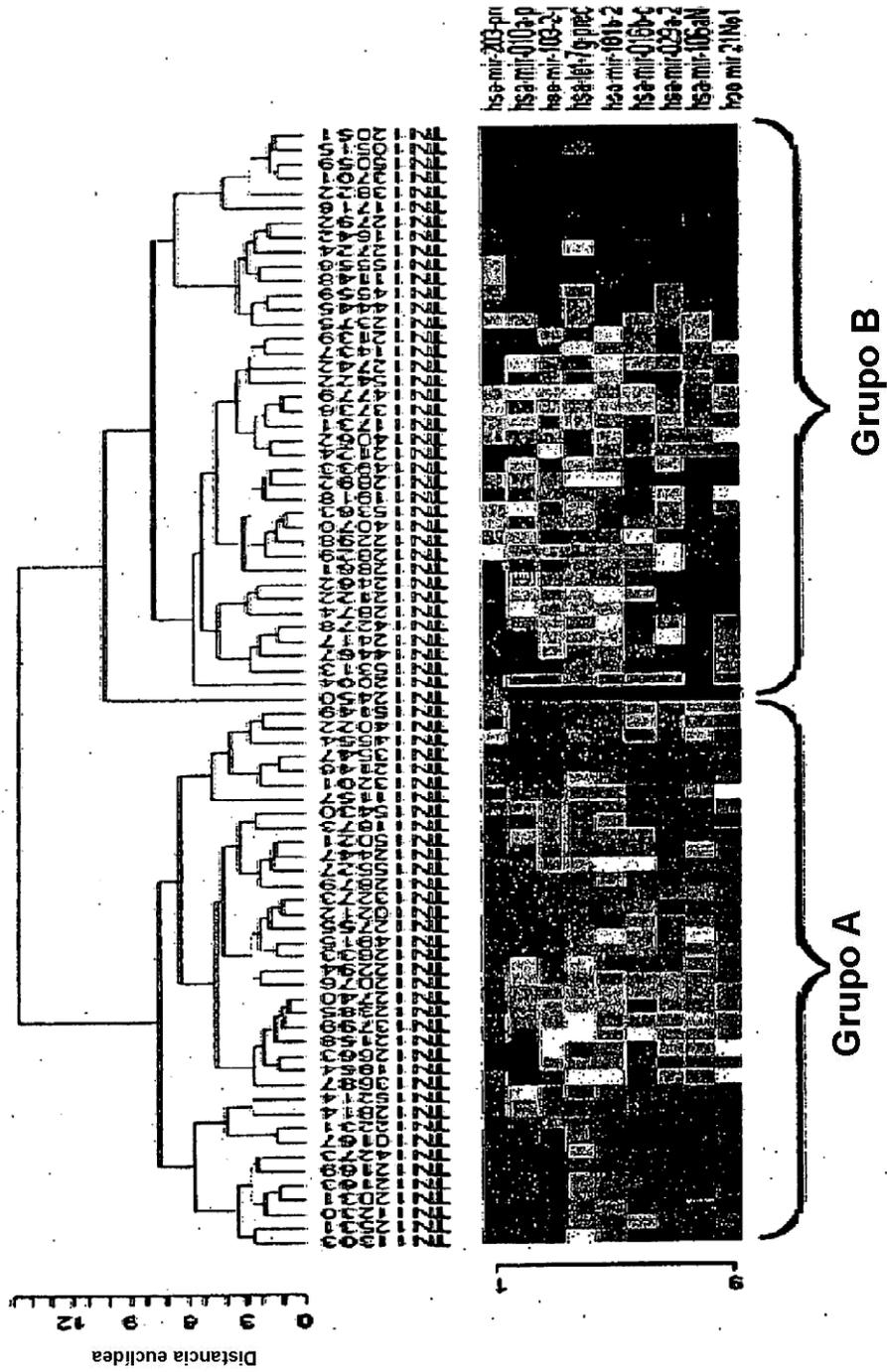


Figura 9a

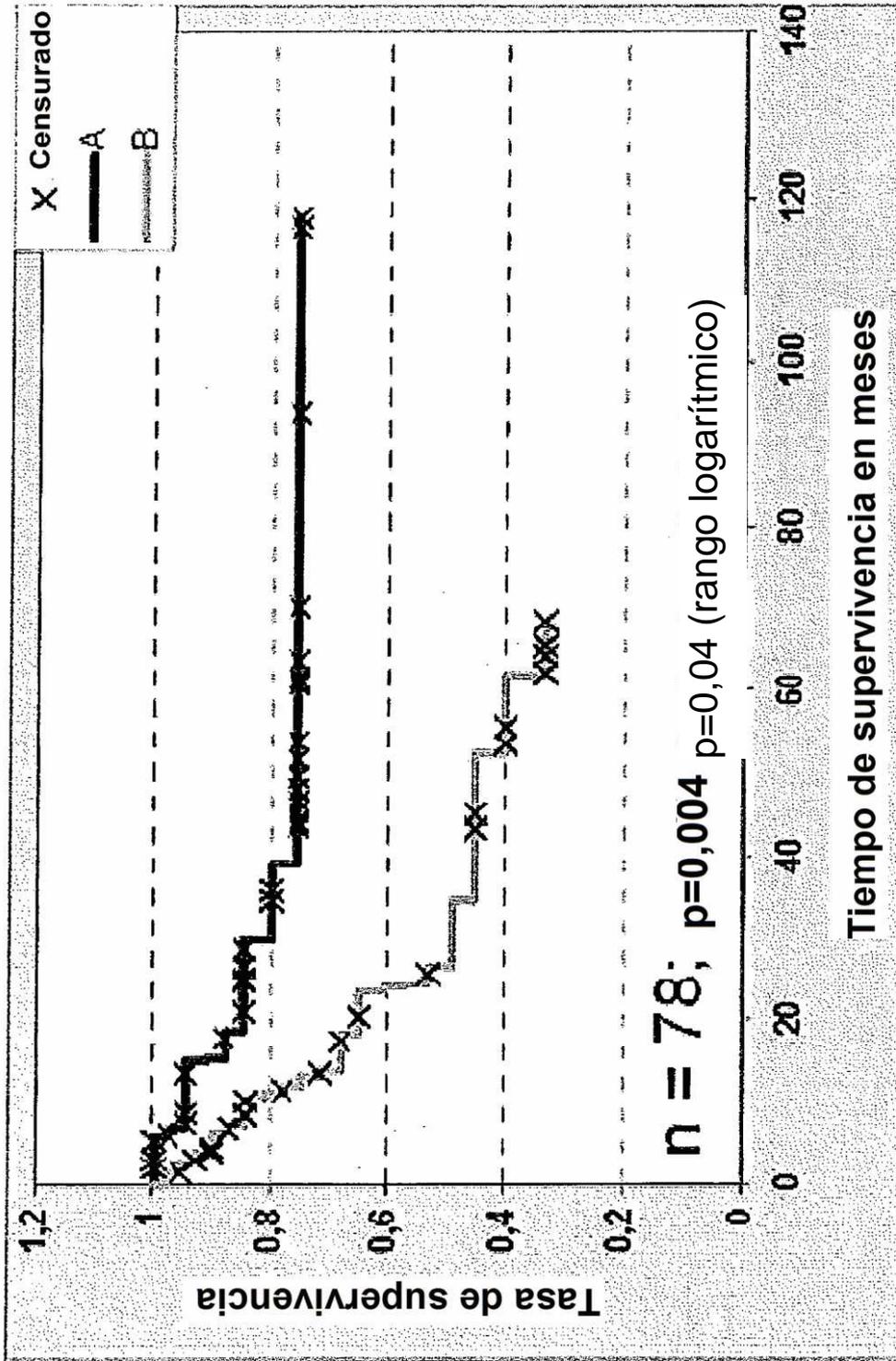


Figura 9b