

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 401**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2012 E 15158185 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2944700**

54 Título: **MicroARN plasmático para la detección de cáncer colorrectal incipiente**

30 Prioridad:

**21.10.2011 US 201161550148 P**

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

**06.04.2018**

73 Titular/es:

**HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA (50.0%)  
Villarroel 170  
08036 Barcelona, ES y  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN  
RED DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS Y  
DIGESTIVAS (CIBEREHD) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GIRONELLA I COS, MERITXELL;  
LOZANO SALVATELLA, JUAN JOSE;  
CASTELLS I GARANGOU, ANTONI y  
GIRALDEZ, MARIA DOLORES**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 662 401 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

MicroARN plasmático para la detección de cáncer colorrectal incipiente

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la detección de cáncer colorrectal, y más particularmente, a microARN plasmáticos para la detección de cáncer colorrectal incipiente.

10 **Antecedentes de la invención**

Sin limitar el alcance de la invención, se describen sus antecedentes en relación con cánceres colorrectales.

15 La solicitud de patente estadounidense n.º 20100317533 (Lou *et al.* 2010) proporciona un panel de biomarcadores de metástasis tumoral que comprende dos cualesquiera de anhidrasa carbónica-9 (CAIX), factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C), efrina A5 (EFNA5), receptor de eph B2 (EPHB2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF-β3), piruvato deshidrogenasa quinasa isoenzima-3 (PDK3), anhidrasa carbónica-12 (CAXII), queratina 14 (KRT14), subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1α) o tenascina C (TNC). CAIX, 20 VEGF-C, EFNA5, EPHB2, TGF-β3 o PDK3 pueden ser indicadores de potencial metastásico moderado, mientras que CAXII, KRT14, HIF-1α o TNC pueden ser indicadores de alto potencial metastásico. También se proporciona un método para determinar el riesgo de metástasis tumoral usando los biomarcadores mencionados anteriormente. Los biomarcadores pueden usarse en el diagnóstico, pronóstico, selección de tratamiento o para someter a prueba posibles opciones terapéuticas. Los biomarcadores pueden usarse para evaluar tumores malignos o cánceres que tienen regiones hipóxicas, tales como cáncer de mama.

25 La solicitud de patente estadounidense n.º 20100120898 (Croce *et al.* 2010) divulga métodos y composiciones para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de carcinoma hepatocelular (HCC). También se proporcionan métodos para identificar agentes anti-HCC. La solicitud de Croce proporciona un método que diagnostica si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (HCC), que comprende medir el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de prueba del sujeto, en el que una alteración en el nivel del producto génico de miR en la muestra de prueba, en relación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de que el sujeto o bien tiene, o bien está en riesgo de desarrollar HCC.

35 La patente estadounidense n.º 7.939.255, expedida a Chung se refiere a métodos de diagnóstico para cáncer colorrectal. Brevemente, la patente divulga un método de diagnóstico y un kit para la evaluación del pronóstico de cáncer colorrectal (CRC) con un gen supresor tumoral que va a usarse para el diagnóstico de cáncer colorrectal (CRC), en el que el método comprende: identificar regiones alteradas de manera recurrente (RAR) en un cromosoma; y detectar alteraciones genómicas en las RAR. Se dice que la invención hace posible realizar un diagnóstico temprano, así como una evaluación del pronóstico para diversos cánceres y tumores incluyendo cáncer colorrectal (CRC).

45 La publicación n.º WO2011076147, titulada, Plasma-Based Micro-RNA Biomarkers And Methods For Early Detection of Colorectal, presentada por Li, divulga un kit de diagnóstico de marcadores moleculares en sangre para diagnosticar cáncer colorrectal, y/o monitorizar el efecto terapéutico para tratar cáncer colorrectal. Se dice que el kit comprende una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, y cada molécula de ácido nucleico codifica para un biomarcador de microARN, en el que una o más de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico se expresan de manera diferencial en plasma de paciente y control sano, y la una o más moléculas de ácido nucleico expresadas de manera diferencial representan juntas un biomarcador de expresión de ácidos nucleicos que es indicativo de la presencia de cáncer colorrectal. Se dice que la invención proporciona además métodos correspondientes que usan tales biomarcadores de expresión de ácido nucleico para identificar cáncer colorrectal, así como para prevenir o tratar un estado de este tipo. Finalmente, la invención proporciona una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de cáncer colorrectal.

55 La publicación n.º WO2011076142, titulada, Compositions And Methods For MicroRNA Expression Profiling in Plasma of Colorectal, también presentada por Li, se dice que enseña composiciones y métodos para la obtención del perfil de expresión de microARN (miARN) en plasma de cáncer colorrectal. En particular, se dice que la invención se refiere a un kit de diagnóstico de marcadores moleculares en sangre para diagnosticar cáncer colorrectal, monitorizar la terapia contra el cáncer y/o tratar cáncer colorrectal que incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, codificando cada molécula de ácido nucleico para una secuencia de microARN, en el que una o más de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico se expresan de manera diferencial en plasma de cáncer colorrectal y plasma de control sano, y en el que la una o más moléculas de ácido nucleico expresadas de manera diferencial representan juntas una firma de expresión de ácido nucleico que es indicativa de la presencia de cáncer colorrectal. La invención se dice que se refiere además a métodos correspondientes para usar tales firmas de expresión de ácido nucleico para identificar cáncer colorrectal, así como para prevenir o tratar un estado de este tipo. Finalmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de cáncer colorrectal.

5 La publicación n.º WO2011088226, titulada, Detection Of Gastrointestinal Disorders, presentada por Christine, se dice que enseña métodos y sistemas para caracterizar un fenotipo detectando microARN, vesículas o biomarcadores que son indicativos de enfermedad o progresión de enfermedad. La enfermedad puede ser un trastorno gastrointestinal, tal como cáncer colorrectal. Los microARN, vesículas o biomarcadores pueden detectarse en un fluido corporal.

10 La publicación n.º WO2010004562, titulada, Methods And Compositions For Detecting Colorectal Cancer, presentada por Baruch, se dice que enseña un método para llevar a cabo una detección temprana mínimamente invasiva de cáncer colorrectal y/o de células precursoras de cáncer colorrectal, usando moléculas de microARN asociadas con cáncer colorrectal, así como diversas moléculas de ácido nucleico relacionadas con el mismo o derivadas del mismo.

15 Finalmente, la publicación n.º WO2011012136, titulada, A Method For Classifying A Human Cell Sample As Cancerous, presentada por Fog, *et al.*, se dice que enseña un método para discriminar entre muestras cancerosas y no cancerosas. Se dice que el método comprende detectar el nivel de al menos un microARN (miR) seleccionado del grupo I de Mir que consiste en: miR-21, miR-34a y miR-141, y detectar el nivel de al menos un miR seleccionado del grupo II de Mir que consiste en: miR-126, miR-143 y miR-145 en una muestra de células de prueba y, comparar el nivel de expresión de dichos miR seleccionados en la muestra de células de prueba con el nivel de expresión de los mismos miR seleccionados en un conjunto de prueba previamente registrado.

**Sumario**

25 Esta descripción incluye un método para diagnosticar o detectar neoplasia colorrectal en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas del sujeto que se sospecha que padece neoplasia colorrectal; medir un patrón o nivel de expresión global de uno o más microARN obtenidos de la una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión global del uno o más microARN de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece neoplasia colorrectal con el patrón de expresión global del uno o más microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece neoplasia colorrectal, en el que la sobreexpresión de una combinación de miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b y miR15b es indicativa de cáncer colorrectal. En un aspecto, el método comprende además el análisis de al menos uno de miR18a, miR29a, o miR335 que en comparación con la expresión del sujeto normal es indicativa de neoplasia colorrectal. En otro aspecto, el método comprende además el análisis de al menos uno de miR29a, miR92a o miR141. En otro aspecto, la una o más muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en uno o más fluidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra fecal. En otro aspecto, el método es capaz de detectar CRC incipiente (I-II) de manera tan precisa como CRC avanzado (estadio II-III), tumores de lado derecho y lesiones de lado izquierdo. En otro aspecto, el método comprende un intervalo de confianza que es del 90, el 91, el 92, el 93, el 94 o el 95 % o mayor. En otro aspecto, el método comprende además determinar el nivel de expresión de microARN que están infraexpresados en neoplasia colorrectal seleccionados de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;
hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;
hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;
hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;

hsa-miR-936;
hsa-miR-379;
hsa-miR-664*;
hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*;
y
hsa-miR-515-3p.

En otro aspecto, el método comprende además determinar el nivel de expresión de microARN que están sobreexpresados en neoplasia colorrectal seleccionados de:

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;
hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p:11.0;
hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a;
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;
hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;
hsa-miR-25;
hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*;
y
hsa-miR-921.

5 En otro aspecto, el nivel de expresión del uno o más microARN se mide mediante la obtención del perfil de expresión de microalineamiento, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR de transcriptasa inversa en tiempo real, PCR cuantitativa en tiempo real, PCR de punto final, PCR múltiple de punto final, PCR fría, PCR helada, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación múltiple *in situ* o secuenciación de ácidos nucleicos.

10 En otro aspecto, el método se usa para tratar un paciente en riesgo o que padece neoplasia colorrectal, seleccionar una terapia de agente antineoplásico para un paciente en riesgo o que padece neoplasia colorrectal, estratificar un paciente en un subgrupo de neoplasia colorrectal o para un ensayo clínico de terapia de neoplasia colorrectal, determinar la resistencia o receptividad a un régimen terapéutico de neoplasia colorrectal, desarrollar un kit para el diagnóstico de neoplasia colorrectal o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, el patrón o nivel de expresión global de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 microARN se selecciona de las tablas 2, 3, 4 y 5, en el que los microARN aumentan la especificidad de la determinación, diagnóstico o detección de neoplasia colorrectal. En otro aspecto, el método comprende además la etapa de usar el patrón o nivel de expresión global de microARN para el pronóstico, guía de tratamiento o monitorización de la respuesta al tratamiento de la neoplasia colorrectal.

20 Esta descripción incluye un biomarcador para la progresión de la enfermedad de neoplasia colorrectal, metástasis o ambas en el que el biomarcador comprende uno o más microARN y un cambio en la expresión global de uno o más microARN en células de neoplasia colorrectal obtenidas de un paciente es indicativo de progresión de la enfermedad de neoplasia colorrectal en comparación con la expresión global de la expresión del uno o más microARN en células de neoplasia colorrectal normales o células de neoplasia colorrectal obtenidas en un punto de tiempo anterior del mismo paciente, en el que la sobreexpresión de la combinación de miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b y miR15b, es indicativa de cáncer colorrectal. En un aspecto, el método comprende además el análisis de uno o más de los

25

## ES 2 662 401 T3

siguientes microARN miR29a, miR92a, miR141, miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a o miR335. En otro aspecto, el biomarcador comprende además microARN que están infraexpresados en neoplasia colorrectal seleccionados de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;
hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;
hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;
hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;
hsa-miR-936;
hsa-miR-379;
hsa-miR-664*;
hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*;
hsa-miR-515-3p.

5

En otro aspecto, el biomarcador comprende además microARN que están sobreexpresados en colorrectal

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;
hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p:11.0;
hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a;
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;
hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;
hsa-miR-25;

## ES 2 662 401 T3

hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*; y
hsa-miR-921.

En otro aspecto, el biomarcador comprende además microARN que están infraexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;
hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;
hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;
hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;
hsa-miR-936;
hsa-miR-379;
hsa-miR-664*;
hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*; y
hsa-miR-515-3p.

5

En otro aspecto, el biomarcador comprende además microARN que están sobreexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;
hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p:11.0;
hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a;
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;

hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;
hsa-miR-25;
hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*;
hsa-miR-921.

El experto en la técnica reconocerá que con más frecuencia una biofirma (ensayo) incluirá la combinación de tanto microARN sobreexpresado como infraexpresado. Como tal, la presente invención también incluye en un aspecto la combinación de tanto microARN sobreexpresado como infraexpresado de microARN respectivos. En otro aspecto, las muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en uno o más fluidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra fecal. En otro aspecto, el método es capaz de detectar CRC incipiente (I-II) de manera tan precisa como CRC avanzado (estadio II-III), tumores de lado derecho y lesiones de lado izquierdo. En otro aspecto, el patrón o nivel de expresión global de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 microARN se selecciona de las tablas 2, 3, 4 y 5, en el que los microARN aumentan la especificidad de la determinación, diagnóstico o detección de neoplasia colorrectal.

Esta descripción incluye un kit para un diagnóstico de neoplasia colorrectal que comprende: reactivos de detección de biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de microARN miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b y miR15b, en el que la sobreexpresión de una combinación de miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b y miR15b es indicativa de neoplasia colorrectal, en el que un intervalo de confianza para cáncer colorrectal es del 90 % o mayor. En un aspecto, el kit comprende además reactivos para la detección y el análisis de al menos uno de miR18a, miR29a, o miR335. En un aspecto, el kit comprende además reactivos para la detección y el análisis de al menos uno de miR29a, miR92a o miR141. En otro aspecto, el kit comprende además instrucciones para el uso en el diagnóstico del riesgo de neoplasia colorrectal, en el que la instrucción comprende indicaciones etapa por etapa para comparar el nivel de expresión de los microARN, cuando se mide la expresión de una muestra obtenida de un sujeto que se sospecha que tiene neoplasia colorrectal con el nivel de expresión de una muestra obtenida de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece neoplasia colorrectal. En otro aspecto, el kit comprende además herramientas, recipientes y reactivos necesarios para obtener muestras de un sujeto seleccionadas del grupo que consiste en uno o más fluidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra fecal. En otro aspecto, el kit comprende además reactivos para el análisis de microARN que están infraexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;
hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;
hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;
hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;
hsa-miR-936;
hsa-miR-379;

hsa-miR-664*;
hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*;
hsa-miR-515-3p.

En otro aspecto, el kit comprende además reactivos para el análisis de microARN que están sobreexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;
hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p:11.0;
hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a;
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;
hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;
hsa-miR-25;
hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*;
hsa-miR-921.

5 En otro aspecto, el kit comprende además reactivos para la detección y el análisis del patrón de expresión o nivel de expresión para 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 microARN que se determina para diagnosticar o detectar neoplasia colorrectal seleccionados de los microARN de las tablas 2, 3, 4 y 5.

10 Aún otra realización de la descripción incluye un método para seleccionar una terapia contra el cáncer para un paciente al que se le ha diagnosticado neoplasia colorrectal, comprendiendo el método: obtener una muestra de un sujeto que tiene una neoplasia colorrectal; y determinar el nivel de expresión de miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a y miR335 en comparación con el nivel de expresión de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece neoplasia colorrectal, en el que la sobreexpresión de los  
15 microARN es indicativa de cáncer colorrectal; y seleccionar la terapia contra el cáncer basándose en la determinación de la neoplasia colorrectal en el paciente.

Otro aspecto incluye un método para realizar un ensayo clínico para evaluar un fármaco candidato que se cree que es útil en el tratamiento de un estado patológico, comprendiendo el método: (a) medir el nivel de microARN  
20 obtenidos de un conjunto de pacientes, en el que los microARN se seleccionan de uno o más microARN seleccionados de microARN miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b y miR15b; (b) administrar un fármaco candidato a un primer subconjunto de los pacientes, y un placebo a un segundo subconjunto de los pacientes; un fármaco comparativo a un segundo subconjunto de los pacientes; o una combinación de fármacos del fármaco candidato y otro agente activo a un segundo subconjunto de pacientes; (c) repetir la etapa (a) tras la administración del fármaco  
25 candidato o el placebo, el fármaco comparativo o la combinación de fármacos; y (d) determinar si el fármaco candidato reduce el número de células neoplásicas colorrectales que tienen un cambio en la expresión de los microARN que es estadísticamente significativa en comparación con cualquier cambio que se produce en el segundo subconjunto de pacientes, en el que una reducción estadísticamente significativa indica que el fármaco candidato es útil en el tratamiento de dicho estado patológico.

5 Aún otro aspecto incluye un método para diagnosticar o detectar neoplasia colorrectal en un sujeto humano que comprende las etapas de: identificar el sujeto humano que padece o se sospecha que padece neoplasia colorrectal; obtener una o más muestras biológicas del sujeto, en el que las muestras biológicas se seleccionan de uno o más fluidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra fecal; medir un patrón o nivel de expresión global de miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a y miR335; y comparar el patrón de expresión global del uno o más microARN de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece neoplasia colorrectal con el patrón de expresión global del uno o más microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece neoplasia colorrectal, en el que la sobreexpresión de microARN: miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a y miR335, es indicativa de cáncer colorrectal.

15 Aún otro aspecto incluye un método para diagnosticar o detectar neoplasia colorrectal en un sujeto humano que comprende las etapas de: identificar el sujeto humano que padece o se sospecha que padece neoplasia colorrectal; obtener una o más muestras biológicas del sujeto, en el que las muestras biológicas se seleccionan de uno o más fluidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra fecal; medir un patrón o nivel de expresión global de uno o más microARN seleccionados de:

50 mejores miARN (UMMA)	AUC	IC bajo	IC alto	punto de corte	S	Sp
hsa-miR-636	0,8079	0,6885	0,9273	0,6074	0,8537	0,6500
hsa-miR-876-3p	0,8402	0,7296	0,9509	0,6403	0,8537	0,7000
hsa-miR-1537	0,8524	0,9464	0,9780	0,699	0,8293	0,8000
hsa-miR-630	0,8256	0,7218	0,9294	0,6619	0,7561	0,7500
hsa-miR-380*	0,8244	0,7269	0,9780	0,7065	0,7317	0,8000
hsa-miR-338-5p	0,8439	0,7296	0,9581	0,7118	0,7317	0,8500
hsa-miR-573	0,8354	0,7243	0,9464	0,6829	0,8500	0,7592
hsa-miR-182*	0,8622	0,7687	0,9557	0,5313	0,8780	0,7000
hsa-miR-518c*	0,8610	0,7471	0,9748	0,5781	0,9024	0,8000
hsa-miR-187*	0,8537	0,7435	0,9638	0,7095	0,7561	0,8500
hsa-miR-1233	0,8707	0,7587	0,9827	0,5828	0,9268	0,8000
hsa-miR-449b	0,8329	0,7146	0,9512	0,6777	0,8049	0,8500
hsa-miR-1204	0,8622	0,7545	0,9699	0,6715	0,8293	0,8500
hsa-miR-518d-3p	0,8512	0,7389	0,9635	0,6514	0,9024	0,7500
hsa-miR-1290	0,8439	0,7338	0,9540	0,7042	0,7805	0,8000
hsa-miR-144:9.1	0,8524	0,7497	0,9552	0,7249	0,7561	0,8000
hsa-miR-105	0,8866	0,7972	0,9760	0,6281	0,8780	0,8000
hsa-miR-298	0,8805	0,7846	0,9764	0,6964	0,8049	0,8500
hsa-miR-491-5p	0,8610	0,7412	0,9807	0,6511	0,8780	0,8000
hsa-miR-576-3p	0,8866	0,7900	0,9830	0,635	0,8537	0,8000
hsa-miR-590-3p	0,8329	0,7122	0,9536	0,6806	0,7805	0,8000
hsa-miR-1257	0,8451	0,7254	0,9649	0,6496	0,7805	0,8000
hsa-miR-1225-3p	0,8683	0,7550	0,9815	0,6726	0,8293	0,8500
hsa-miR-127-3p	0,8683	0,7648	0,9718	0,5883	0,9024	0,7500
hsa-miR-936	0,8744	0,7743	0,9745	0,5981	0,8780	0,8000
hsa-miR-379	0,8732	0,7839	0,9624	0,5632	0,9268	0,7000
hsa-miR-664*	0,8171	0,6895	0,9446	0,6124	0,9024	0,7000
hsa-miR-548j	0,8232	0,7127	0,9337	0,5905	0,8537	0,7000
hsa-miR-130b*	0,8518	0,7534	0,9502	0,7281	0,7805	0,7500
hsa-miR-515-3p	0,8659	0,7779	0,9538	0,5678	0,8537	0,7000
hsa-miR-302b	0,8280	0,7084	0,9477	0,5507	0,9024	0,7000
hsa-miR-125a-5p	0,8354	0,7242	0,9465	0,7217	0,7317	0,8500
hsa-miR-424	0,8463	0,7439	0,9488	0,6183	0,8537	0,7000
hsa-miR-125b	0,8488	0,7417	0,9558	0,7011	0,8049	0,8000
hsa-miR-100	0,8463	0,7328	0,9599	0,6536	0,8780	0,8000
hsa-miR-768-3p:11.0	0,8110	0,6945	0,9275	0,6736	0,7561	0,7500
hsa-miR-24	0,8317	0,7142	0,9493	0,6589	0,7805	0,7500
hsa-miR-23a	0,8659	0,7626	0,9690	0,5803	0,9268	0,7000
hsa-miR-1274b	0,8390	0,7303	0,9477	0,7056	0,7561	0,8000
hsa-miR-27a	0,8049	0,6821	0,9276	0,7093	0,7561	0,7500
hsa-miR-26b	0,8220	0,7122	0,9317	0,714	0,7561	0,7500
hsa-miR-30d	0,8311	0,7199	0,9422	0,6859	0,7805	0,8000
hsa-miR-520h,hsa-miR-520g	0,8427	0,7403	0,9451	0,7064	0,7561	0,8500
hsa-miR-302a	0,9024	0,8114	0,9935	0,6163	0,9268	0,8000
hsa-miR-518c	0,8610	0,7159	0,9402	0,5781	0,9024	0,8000

hsa-miR-335	0,8061	0,6837	0,9285	0,6744	0,7805	0,7000
hsa-miR-29a	0,8573	0,7427	0,9719	0,6418	0,8293	0,8000
hsa-miR-152	0,8329	0,7287	0,9372	0,716	0,7561	0,7500
hsa-miR-191	0,8463	0,7387	0,9540	0,6702	0,8293	0,7500
hsa-miR-17	0,8329	0,7164	0,9495	0,6218	0,6218	0,8000
hsa-miR-19b	0,8238	0,7006	0,9470	0,6582	0,8293	0,7500
hsa-miR-30a	0,8720	0,7641	0,9798	0,6823	0,8049	0,8500
hsa-miR-151-5p	0,8280	0,7062	0,9499	0,6133	0,8537	0,7500
hsa-miR-92a	0,8598	0,7634	0,9561	0,5437	0,9268	0,6500
hsa-miR-25	0,8549	0,7572	0,9525	0,7136	0,7561	0,8000
hsa-miR-15b	0,8329	0,7215	0,9443	0,6642	0,8049	0,7000
hsa-miR-15a	0,8585	0,7564	0,9607	0,6298	0,8537	0,7500
hsa-miR-30e*	0,8707	0,7810	0,9605	0,7165	0,7805	0,8500
hsa-miR-132*	0,8463	0,7280	0,9647	0,5986	0,9024	0,8000
hsa-miR-921	0,8476	0,7263	0,9689	0,6769	0,8537	0,8500

5 en el que ROC son los parámetros de área bajo la curva (AUC), IC es un intervalo de confianza del 95 %, S es la sensibilidad, y Sp es la especificidad; y comparar el patrón de expresión global del uno o más microARN obtenidos de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece neoplasia colorrectal con el patrón de expresión global del uno o más microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece neoplasia colorrectal, en el que un cambio en el patrón de expresión global del uno o más microARN en la muestra biológica del sujeto es indicativo de neoplasia colorrectal. En un aspecto, los microARN están infraexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;
hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;
hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;
hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;
hsa-miR-936;
hsa-miR-379;
hsa-miR-664*;
hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*;
hsa-miR-515-3p.

10

En otro aspecto, los microARN están sobreexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;
hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p:11.0;

hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a;
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;
hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;
hsa-miR-25;
hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*;
hsa-miR-921.

5 En otro aspecto, el nivel de expresión del uno o más microARN se mide mediante la obtención del perfil de expresión de microalineamiento, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR de transcriptasa inversa en tiempo real, PCR cuantitativa en tiempo real, PCR de punto final, PCR múltiple de punto final, PCR fría, PCR helada, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación múltiple *in situ* o secuenciación de ácidos nucleicos.

10 En otro aspecto, el método se usa para tratar un paciente en riesgo o que padece neoplasia colorrectal, seleccionar una terapia de agente antineoplásico (por ejemplo, agentes de reticulación de ácidos nucleicos, pequeñas moléculas, agentes biológicos tales como anticuerpos monoclonales con o sin cargas de destrucción celular, tanto dirigidos como no dirigidos) para un paciente en riesgo o que padece neoplasia colorrectal, estratificar un paciente en un subgrupo de neoplasia colorrectal o para un ensayo clínico de terapia de neoplasia colorrectal, determinar la resistencia o receptividad a un régimen terapéutico de neoplasia colorrectal, desarrollar un kit para el diagnóstico de neoplasia colorrectal o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, el patrón o nivel de expresión global de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 microARN se determina para diagnosticar o  
15 detectar neoplasia colorrectal.

### Breve descripción de los dibujos

20 Para una comprensión más completa de las características y ventajas de la presente invención, se hace ahora referencia a la descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas y en las que:

25 las figuras 1A y 1B muestran la expresión de miARN diferencial mediante microalineamientos entre pacientes con CRC y controles del conjunto 1 (figura 1A), y entre pacientes con AA y controles (figura 1B). El mapa de calor muestra los 50 miARN significativamente desregulados con el FC más alto. Los píxeles de color rojo corresponden a un aumento de la abundancia de miARN en la muestra de plasma indicada, mientras que los píxeles de color verde indican una disminución de los niveles de miARN.

30 La figura 2 es un gráfico del análisis entre grupos (BGA) que muestra el agrupamiento de las muestras basándose en la obtención del perfil de expresión de miARN. Controles sanos (C); pacientes con cáncer colorrectal (CRC); pacientes con adenomas avanzados (AA).

35 La figura 3 muestra gráficos de cajas que muestran la expresión de miARN plasmático en el conjunto 2 de CRC determinada mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión de miARN se normalizan a miR16 y se representan como valores de -dCt. Las líneas dentro de las cajas indican las medianas. Las cajas marcan el intervalo entre los percentiles 25 y 75.

40 Las figuras 4A y 4B son análisis de características operativas del receptor (ROC) para la firma de dos miARN plasmáticos: miR19a + miR19b (figura 4A) y la firma de tres miARN plasmáticos: miR19a + miR19b + miR15b (figura 4B) según los resultados obtenidos a partir de la obtención del perfil de microalineamientos en el conjunto 1 de CRC y los datos de qRT-PCR en el conjunto 2 de CRC.

## Descripción detallada

5 Para facilitar la comprensión de esta invención, se definen varios términos a continuación. Los términos definidos en el presente documento tienen significados tal como entiende comúnmente un experto habitual en las áreas relevantes para la presente invención. Términos tales como “un”, “una” y “el/la” no pretenden referirse a solo una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la cual puede usarse un ejemplo específico para ilustración. La terminología en el presente documento se usa para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, excepto tal como se señala en las reivindicaciones.

10 Abreviaturas: adenomas avanzados, AA; área bajo la curva de ROC, AUC; análisis entre grupos, BGA; cáncer colorrectal, CRC; cambio en veces, FC; modelos lineales para datos de microalineamientos, LIMMA; microARN, miARN; curva de características operativas del receptor, curva de ROC.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “cáncer colorrectal” y “neoplasia colorrectal” incluyen la definición médica bien aceptada que define el cáncer colorrectal como un estado médico caracterizado por cáncer de células del tubo gastrointestinal por debajo del intestino delgado (es decir, el intestino grueso (colon), incluyendo el ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, colon sigmoide y recto) e incluye precáncer (también denominado en el presente documento adenomas avanzados), cáncer en fase inicial y cáncer en fase terminal. Adicionalmente, tal como se usa en el presente documento, el término “cáncer colorrectal” también incluye además estados médicos que se caracterizan por cáncer de células del duodeno e intestino delgado (yeyuno e ileon).

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra de tejido” (el término “tejido” se usa de manera intercambiable con el término “muestra de tejido”) se refiere a e incluye cualquier material compuesto por una o más células, o bien individuales o bien en complejo con cualquier matriz o en asociación con cualquier compuesto químico. La definición incluirá cualquier material biológico u orgánico y cualquier subporción, producto o subproducto celular del mismo. La definición de “muestra de tejido” debe entenderse que incluye sin limitación esperma, óvulos, embriones y componentes sanguíneos. También se incluyen dentro de la definición de “tejido” para los propósitos de esta invención determinadas estructuras acelulares tales como capas dérmicas de la piel que tienen un origen celular pero que ya no se caracterizan como celulares. El término “deposición” tal como se usa en el presente documento es un término clínico que se refiere a heces excretadas por humanos.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “gen” se refiere a una unidad que codifica para una proteína, un polipéptido o un péptido funcional. Tal como entenderán los expertos en la técnica, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc o fragmentos o combinaciones de los mismos, así como productos génicos, incluyendo los que se han alterado artificialmente. Se usan genes, ácidos nucleicos y proteína y similares purificados para referirse a estas entidades cuando se identifican y se separan de al menos un ácido nucleico o proteína contaminante con la que están asociados habitualmente. El término “alelo” o “forma alélica” se refiere a una versión alternativa de un gen que codifica para la misma proteína funcional pero que contiene diferencias en la secuencia de nucleótidos en relación con otra versión del mismo gen.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “microARN” (“miARN” o “miR”) se refiere a un ARN (o análogo de ARN) que comprende el producto de un gen endógeno, no codificante cuyos transcritos de ARN precursor pueden formar horquillas pequeñas de las que se escinden “miARN” maduros mediante, por ejemplo, Dicer. Los “miARN” se codifican en genes distintos de los ARNm cuya expresión controlan.

50 Tal como se usa en el presente documento, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y fragmentos generados mediante cualquiera de ligación, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos que se producen de manera natural (tales como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos que se producen de manera natural (por ejemplo, formas a-enantioméricas de nucleótidos que se producen de manera natural), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcares incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más grupos hidroxilo por halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, el resto de azúcar completo puede reemplazarse por estructuras estérica y electrónicamente similares, tales como aza-azúcares y análogos de azúcares carbocíclicos. Los ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Pueden unirse monómeros de ácido nucleico mediante enlaces fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforanilidato, fosforamidato, y similares. El término “molécula de ácido nucleico” también incluye los denominados “ácidos nucleicos peptídicos”, que comprenden bases de ácido nucleico modificadas o que se producen de manera natural unidas a una estructura principal de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser o bien monocatenarios o bien bicatenarios.

El término “biomarcador” tal como se usa en el presente documento en diversas realizaciones se refiere a un compuesto bioquímico específico en el organismo que tiene una característica molecular particular que lo hace útil para diagnosticar y medir el progreso de la enfermedad o los efectos del tratamiento. Por ejemplo, los metabolitos o biomarcadores comunes encontrados en el aliento de una persona, y la condición de diagnóstico respectiva de la persona que proporciona tal metabolito incluyen, pero no se limitan a, acetaldehído (fuente: etanol, X-treonina; diagnóstico: intoxicación), acetona (fuente: acetoacetato; diagnóstico: dieta/diabetes), amoniaco (fuente: desaminación de aminoácidos; diagnóstico: uremia y enfermedad hepática), CO (monóxido de carbono) (fuente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , % de COHb elevada; diagnóstico: contaminación del aire de interiores), cloroformo (fuente: compuestos halogenados), diclorobenceno (fuente: compuestos halogenados), dietilamina (fuente: colina; diagnóstico: sobrecrecimiento de bacterias intestinales), H (hidrógeno) (fuente: intestinos; diagnóstico: intolerancia a la lactosa), isopreno (fuente: ácido graso; diagnóstico: estrés metabólico), metanotiol (fuente: metionina; diagnóstico: sobrecrecimiento de bacterias intestinales), metil etil cetona (fuente: ácido graso; diagnóstico: contaminación del aire de interiores/dieta), O-toluidina (fuente: metabolito de carcinoma; diagnóstico: carcinoma broncogénico), sulfuros y sulfuros de pentano (fuente: peroxidación de lípidos; diagnóstico: infarto de miocardio), H<sub>2</sub>S (fuente: metabolismo; diagnóstico: enfermedad periodontal/ovulación), MeS (fuente: metabolismo; diagnóstico: cirrosis) y Me<sub>2</sub>S (fuente: infección; diagnóstico: gingivitis ulceronecrosante aguda).

El término diferencias “estadísticamente significativas” entre los grupos estudiados se refiere a una condición en la que usando el análisis estadístico apropiado (por ejemplo, prueba de ji-cuadrado, prueba de la t) la probabilidad de que los grupos sean iguales es inferior al 5 %, por ejemplo  $p < 0,05$ . En otras palabras, la probabilidad de obtener los mismos resultados en una base completamente aleatoria es inferior a 5 de 100 intentos.

El término “kit” o “kit de pruebas” denota combinaciones de reactivos y adyuvantes requeridos para un análisis. Aunque un kit de pruebas consiste en la mayoría de los casos de varias unidades, también están disponibles elementos de análisis de una pieza, que deben considerarse asimismo kits de pruebas.

El término “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) tal como se usa en el presente documento se refiere al método de K.B. Mullis, patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188, incorporadas por el presente documento como referencia, que describen un método para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación. Este procedimiento para amplificar la secuencia diana consiste en introducir un gran exceso de dos cebadores de oligonucleótido en la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido por una secuencia precisa de ciclado término en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios a sus hebras respectivas de la secuencia diana bicatenaria. Para efectuar la amplificación, se desnaturaliza la mezcla y entonces se aparean los cebadores con sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Tras el apareamiento, se extienden los cebadores con una polimerasa para formar un nuevo par de hebras complementarias. Las etapas de desnaturalización, apareamiento de los cebadores y extensión con polimerasa pueden repetirse muchas veces (es decir, la desnaturalización, el apareamiento y la extensión constituyen un “ciclo”; puede haber numerosos “ciclos”) para obtener una alta concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina por las posiciones relativas de los cebadores uno con respecto al otro y, por tanto, esta longitud es un parámetro controlable. En virtud del aspecto de repetición del procedimiento, el método se denomina “reacción en cadena de la polimerasa” (a continuación en el presente documento PCR).

Tal como se usa en el presente documento, el uno o más microARN puede medirse mediante la obtención del perfil de expresión de microalineamiento, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR de transcriptasa inversa en tiempo real, PCR cuantitativa en tiempo real, PCR de punto final, PCR múltiple de punto final, PCR helada, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación múltiple *in situ* o secuenciación de ácidos nucleicos. Sin embargo, pueden usarse otras técnicas para determinar la expresión de microARN tal como resonancia de plasmones superficiales, efectos de resonancia de fluorescencia (transferencia, extinción y variantes de las mismas) o la siguiente generación de cualquiera de las técnicas enumeradas anteriormente y combinaciones de las mismas, todas las cuales están dentro del alcance de la presente invención. El nivel de expresión global del uno o más microARN puede usarse para aumentar la sensibilidad y calidad de la determinación de la presencia de la neoplasia colorrectal. Por ejemplo, es típico que un aumento en la sensibilidad vaya acompañado por un aumento en el número de microARN medidos, por ejemplo, cuantos más microARN se midan (por ejemplo, 2 frente a 8 o 15 frente a 30) hay un aumento concomitante en la calidad de la determinación tal como conocen bien los expertos en la técnica en el área de niveles de expresión. El experto en la técnica reconocerá que lo más a menudo una biofirma (ensayo) incluirá la combinación de microARN tanto sobreexpresados como infraexpresados. Como tal, la presente invención también incluye en un aspecto la combinación de tanto microARN sobreexpresados como infraexpresados de microARN respectivos.

La presente invención puede usarse para el diagnóstico y tratamiento de pacientes, que incluye o puede ampliarse a pronóstico, guía de tratamiento, monitorización de la respuesta al tratamiento, uso en ensayos clínicos, investigación y combinaciones de los mismos. El experto en la técnica reconocerá que la detección de los microARN identificados en el presente documento puede usarse para cualquiera de estos usos.

Los microARN (miARN) son moléculas de ARN no codificante conservadas evolutivamente, endógenas, pequeñas de 20-22 nucleótidos que funcionan como reguladores de la expresión génica. Pruebas recientes han mostrado que los miARN regulan diversos procesos celulares cruciales tales como desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis. Se cree que desempeñan un papel importante en el inicio y la progresión de cáncer humano, actuando como oncogenes o supresores de tumores [1].

Se han observado cambios en los perfiles de expresión de miARN en diversos tejidos en una variedad de patologías humanas incluyendo cáncer. Hasta la fecha, cada tipo de tumor analizado mediante obtención del perfil tisular de miARN ha mostrado perfiles de miARN significativamente diferentes en comparación con células normales del mismo tejido [2-4]. Además, algunos informes recientes han demostrado que están presentes miARN en el suero y el plasma de humanos y otros animales [5-7]. Los niveles circulantes de miARN son bastante estables, reproducibles y constantes entre individuos de la misma especie [5]. Por tanto, la obtención del perfil de expresión de miARN circulante es muy prometedora como estrategia no invasiva nueva para el diagnóstico de cáncer y otras enfermedades.

El cáncer colorrectal (CRC) es el segundo cáncer más común en los países occidentales, y representa la segunda causa principal de muerte relacionada con cáncer [8]. Afortunadamente, hay pruebas de que el examen de individuos de riesgo promedio puede dar como resultado una reducción de la incidencia y mortalidad mediante la detección temprana de cáncer y la eliminación de las lesiones precursoras de cáncer [9]. De hecho, el objetivo de los programas de examen es la detección de CRC en fase inicial y adenomas avanzados (AA) que son lesiones premalignas asociadas con un alto riesgo de progresión a una lesión invasiva.

Actualmente, no hay ninguna estrategia óptima y universalmente aceptada para el examen de CRC [10,11] y las pruebas basadas en heces se ven dificultadas por su limitada sensibilidad, la colonoscopia constituye un enfoque invasivo [12]. Por tanto, se necesitan urgentemente nuevos enfoques que puedan complementar y mejorar las estrategias actuales. En ese sentido, estudios previos han encontrado que algunos miARN están aumentados en plasma de pacientes con CRC, lo que sugiere un posible papel como biomarcadores no invasivos (13-16).

Sin embargo, todos ellos estaban limitados al análisis de un pequeño número de miARN. Por consiguiente, es obligatorio caracterizar adicionalmente la obtención del perfil de miARN plasmáticos mediante técnicas de alto rendimiento y evaluar sus características de rendimiento en la detección de individuos que albergan CRC y/o lesiones precursoras de cáncer. En el presente estudio, se realizó una obtención del perfil de miARN plasmáticos mediante microalineamientos en un conjunto de pacientes con CRC o AA, e individuos sanos, identificando un grupo de miARN que podían detectar pacientes con neoplasia colorrectal con alta capacidad de discriminación. La validación en una cohorte independiente de individuos y el uso de una tecnología diferente permite confirmar 6 miARN plasmáticos como biomarcadores muy prometedores para el diagnóstico no invasivo de CRC.

Los miARN circulantes son muy prometedores como biomarcadores nuevos para el diagnóstico de cáncer y otras enfermedades. Se necesitan urgentemente nuevos enfoques no invasivos que puedan complementar y mejorar las estrategias actuales para el examen de cáncer colorrectal (CRC). Se realizó la obtención del perfil de expresión de miARN plasmáticos en todo el genoma mediante microalineamientos en un conjunto de individuos (n = 61) incluyendo pacientes con CRC o con lesiones premalignas tales como adenomas colorrectales avanzados (AA), y sujetos sanos. Se usó qRT-PCR en tiempo real para validar la expresión de miARN seleccionados en una cohorte independiente de pacientes de otro hospital (n = 135). Los pacientes con CRC o AA mostraron perfiles de expresión de miARN plasmáticos significativamente diferentes en comparación con los controles. Se seleccionó un grupo de 13 miARN para que se validaran en una cohorte independiente de pacientes, y se confirmó que 6 de ellos estaban significativamente sobreexpresados en el grupo de CRC, mostrando una alta exactitud de discriminación. Se confirmó que uno de estos 6 miARN también estaba significativamente sobreexpresado en pacientes con AA, con una capacidad de discriminación moderada.

Se incluyeron de manera prospectiva un total de 273 sujetos de dos hospitales (Hospital Clinic de Barcelona, Cataluña, España y Hospital de Donostia, Guipúzcoa, España). De ellos, se excluyeron 77 debido a que cumplían cualquiera de los siguientes criterios: diagnóstico clínico de poliposis adenomatosa familiar o síndrome de Lynch, presencia de más de 10 adenomas colorrectales, diagnóstico de cáncer en otros sitios en el momento de la selección, presencia de enfermedad inflamatoria del intestino, estar sometiéndose a quimioterapia o radioterapia en el momento de la toma de muestras de sangre, examen incompleto del intestino, preparación inadecuada del intestino en la colonoscopia de diagnóstico o la presencia de hemólisis en muestras de plasma. Finalmente, se incluyeron 196 individuos: 123 pacientes recién diagnosticados con neoplasia colorrectal esporádica (63 con CRC y 40 con AA) y 73 individuos sanos sin historia personal de ningún cáncer y con una colonoscopia reciente que confirma la ausencia de lesiones neoplásicas colorrectales. Los pacientes con AA fueron aquellos con adenomas que tenían un tamaño de al menos 10 mm o que tenían histológicamente displasia de alto grado o > 20 % de componente vellosa. Estos individuos se dividieron en dos conjuntos diferentes y no relacionados: conjunto 1, 61 sujetos del Hospital Clinic de Barcelona, que se emplearon para realizar la obtención del perfil de microARN plasmáticos en todo el genoma; y conjunto 2, 135 sujetos del Hospital de Donostia, que se reclutaron para validar adicionalmente los resultados obtenidos en el conjunto 1. Las características de los participantes se muestran en la

tabla 1. Se recogieron muestras de sangre antes de la endoscopia o la cirugía en todos los individuos.

Tabla 1. Características de los pacientes.

	Conjunto 1 (microalineamiento)		Conjunto 2 (qRT-PCR)	
	Control (n = 20)	Neoplasma (n = 41)	Control (n = 53)	Neoplasma (n = 82)
Edad promedio (DE)	60,6 (12,5)	72,5 (9,7)	62,1 (3,5)	62,8 (6,3)
Género -n.º				
Hombre	11	20	26	42
Mujer	9	21	27	40
Características de cáncer colorrectal				
Pacientes -n.º	-	21	-	42
Estadio de TNM -n.º				
I	-	4	-	8
II	-	8	-	13
III	-	6	-	16
IV	-	3	-	5
Ubicación -n.º				
Proximal	-	10	-	14
Distal	-	11	-	28
Características de adenoma				
Pacientes -n.º	-	20	-	40
Tamaño ≥1 cm -n.º	-	20	-	36
Tamaño medio (mm)	-	22,4	-	11,5
Displasia de alto grado -n.º	-	3	-	0
Componente vellosa -n.º	-	10	-	23
Morfología sésil -n.º	-	10	-	5

5 El Comité de Ética Institucional del Hospital Clinic de Barcelona aprobó el estudio (fecha de aprobación: 26/03/2009), y se obtuvo consentimiento informado por escrito de todos los participantes según la Declaración de Helsinki.

10 Extracción de ARN a partir de muestras de plasma. Se recogieron veinte ml de sangre completa de cada participante en tubos de EDTA. Se colocaron las muestras de sangre a 4 °C hasta la separación del plasma, y se congeló el plasma en el plazo de 6 horas de la extracción de la sangre. Brevemente, se centrifugaron las muestras a 1600 x g durante 10 minutos a 4 °C para desacelerar las células sanguíneas, y se transfirió el plasma a tubos nuevos, seguido por centrifugación adicional a 16 000 x g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar completamente los componentes celulares. Entonces se tomaron alícuotas del plasma y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Se aisló ARN total que contenía ARN pequeños a partir de 550 µl de plasma usando reactivo Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el kit miRNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Alemania), según el protocolo del fabricante con las siguientes modificaciones. Se añadió reactivo Trizol LS a muestras de plasma en una razón volumétrica 2:1. Tras la separación de fases mediante adición de cloroformo y centrifugación, se separó la fase acuosa a un nuevo tubo y se añadió adicionalmente un volumen de Trizol LS. Tras la segunda separación de fases, se añadieron 1,5 volúmenes de etanol al 100 % a la fase acuosa y se cargó la mezcla en una columna miRNeasy, según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo tratamiento con ADNasa (Qiagen) para eliminar cualquier ADN contaminante. El volumen de elución final era de 30 µl. Se cuantificó la concentración de ARN usando NanoDrop 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE) en todas las muestras y osciló entre 3 y 35 ng/µl. Se repitió el procedimiento de extracción para cada muestra hasta obtener una cantidad de ARN suficiente para las siguientes etapas.

30 Obtención del perfil de miARN plasmáticos en todo el genoma mediante microalineamiento. Se realizó la obtención del perfil de expresión de miARN en todas las muestras del conjunto 1 usando el ensayo de obtención del perfil de expresión de microARN basándose en la plataforma SAM-Bead Array (Illumina, Inc. San Diego, CA). Este microalineamiento contiene 1146 sondas, incluyendo 743 miARN validados, que detectan alrededor del 97 % de los miARN humanos anotados en la base de datos miRBase Sanger v.12.0. Se realizó el ensayo de microalineamiento de miARN usando 200 ng de ARN total por muestra. Se realizaron todas las etapas según el protocolo del fabricante, tal como se describió previamente [13,14]. Se extrajeron los datos usando el software de análisis de datos BeadStudio y se transformaron a la escala logarítmica de base 2. Se normalizaron por cuantiles los datos de microalineamiento usando el paquete bioconductor Lumi [15].

40 Análisis de la expresión de miARN mediante qRT-PCR en tiempo real. Se analizó la expresión de miARN mediante qRT-PCR en tiempo real con un procedimiento de preamplificación múltiple previo. Brevemente, se transcribieron de manera inversa 21 ng de ARN plasmático con una mezcla de cebadores Megaplex RT (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) y se preamplificaron con cebadores Megaplex PreAmp y TaqMan PreAmp MasterMix (Applied

Biosystems Inc.) durante 14 ciclos. Se evaluó la expresión de cada miARN mediante qPCR usando ensayos de miARN TaqMan (Applied Biosystems Inc.) en un sistema de PCR en tiempo real Vii7 (Applied Biosystems Inc.). Se analizaron varios supuestos ARN nucleares pequeños de mantenimiento con el fin de determinar el más adecuado en las muestras (RNU6B, miR16, miR423-5p, RNU48, miR544, miR103, miR525, miR451). MiR16 presentó la mayor estabilidad y abundancia y, por tanto, se normalizaron los niveles de expresión de miARN a miR16 como control interno en concordancia con otras publicaciones [16,17]. Se calcularon los valores de Ct a partir del umbral automático. Ningún control de molde mostró amplificación. Se incluyeron tres réplicas técnicas para cada punto de qPCR. Se calcularon los niveles de expresión relativa de miARN seleccionados para cada muestra como valores de  $\Delta\Delta Ct$  [ $\Delta\Delta Ct = Ct$  de miARN diana -  $Ct$  de miARN de control interno].

Análisis estadístico. Se usó un modelo lineal para datos de microalineamiento (LIMMA) para identificar miARN expresados de manera diferencial entre grupos. LIMMA usa modelos lineales y estadísticos de F y estadísticos de t moderada apareada de Bayes empírica [18]. Se usaron los miARN más significativos usando estadística de F para realizar el análisis de correspondencia tal como se implementa en la función de análisis entre grupos (BGA) incluida en el paquete made4 [19]. Este método es capaz de visualizar datos de alta dimensión (tal como mediciones de expresión múltiple) en un gráfico 2D en el que las áreas delimitadas por las elipses representan el 95 % de la distribución binormal estimada de las puntuaciones de muestra en los ejes primero y segundo [20], se realizaron diagramas de Venn considerando como acierto solo miARN con un cambio en veces absoluto mayor de 1,5 y un valor de p moderado  $< 0,05$  (VennCounts y VennDiagram del paquete de LIMMA). Se analizaron las variables cuantitativas usando la prueba de Student. Se consideró un valor de p bilateral  $< 0,05$  como significativo. Se calculó la evaluación de la predictibilidad de miARN individuales y diferentes combinaciones de miARN, ajustadas por edad y género, usando regresión logística (distribución binomial GLM). Se calcularon gráficos de análisis de ROC y puntos de corte derivados, así como parámetros de precisión de discriminación global usando el paquete DiagnosisMed R. Se calcularon la sensibilidad y especificidad a partir del punto de corte óptimo asociado con la distancia mínima entre la curva de ROC y la esquina superior izquierda.

Obtención del perfil de miARN en todo el genoma en muestras de plasma de pacientes con cáncer colorrectal. La expresión de miARN plasmáticos discrimina pacientes con cáncer colorrectal de individuos sanos. Para evaluar la obtención del perfil de expresión de miARN circulante diferente entre pacientes con CRC e individuos sanos, se llevaron a cabo experimentos de microalineamiento de miARN en ARN total obtenido de muestras de plasma de 21 pacientes con CRC y 20 controles sanos. Para investigar adicionalmente si se encontraron patrones de expresión de miARN alterados en pacientes con lesiones precursoras de cáncer colorrectal, también se realizaron experimentos de microalineamiento de miARN en ARN plasmático de 20 pacientes con adenomas colorrectales avanzados (AA).

Un análisis estadístico comparativo inicial que empleaba LIMMA produjo un total de 93 miARN significativamente desregulados ( $p < 0,05$ ) en pacientes con CRC en comparación con individuos sanos, y 125 miARN cuando se compararon pacientes con AA con controles sanos. Todos los datos de microalineamiento están disponibles en GEO (número de registro: GSE 25609). Las figuras 1A y 1B muestran mapas térmicos que incluyen los 50 miARN con el cambio en veces significativo más alto entre pacientes con CRC y controles (figura 1A), y entre pacientes con AA y controles (figura 1B). Los valores de p y las diferencias de cambio en veces, así como los parámetros de predictibilidad correspondientes para estos miARN en CRC o AA se muestran en las tablas 2-3 y 4-5, respectivamente. Entonces se realizó un gráfico de BGA para representar visualmente la proximidad entre pacientes que albergan CRC o AA, y controles según la expresión de miARN plasmáticos. Tal como se representa en la figura 2, los pacientes con CRC o AA, y los individuos sanos aparecieron como tres grupos claramente separados. También se analizaron las especificidades de expresión de miARN de cada tipo de lesión neoplásica, es decir, CRC y AA, en comparación con muestras de control usando análisis de Venn (figura 2). Se encontró que un subconjunto de 21 y 28 miARN se regulaban por incremento de manera exclusiva y significativa en pacientes con CRC y AA, respectivamente, mientras que ambos tipos de pacientes neoplásicos compartían 24 miARN regulados por incremento de manera significativa. Por tanto, cada lesión neoplásica colorrectal tiene un perfil de expresión de miARN particular, pero ambas comparten también un número importante de miARN desregulados, lo que podría permitir la identificación de ambas lesiones usando una única prueba basada en una firma de miARN plasmático común.

Tabla 2. Parámetros de cambio en veces y valor de p para los 50 mejores miARN desregulados en CRC que muestran los cambios en veces más altos.

50 mejores miARN	n.º de MIMAT	FC	P
hsa-miR-302a	MIMAT0000684	10,57	0,0002
hsa-miR-30a	MIMAT0000087	9,43	0,0001
hsa-miR-302b	MIMAT0000714	5,97	0,0042
hsa-miR-565:9.1	MI0003571	5,69	0,0010
hsa-miR-191	MIMAT0000440	5,32	0,0061
hsa-miR-125b	MIMAT0000423	5,27	0,0022
hsa-miR-100	MIMAT0000098	4,69	0,0180
hsa-miR-194	MIMAT0000460	4,67	0,0160

hsa-miR-27a	MIMAT0000084	4,53	0,0045
hsa-miR-424	MIMAT0001341	4,47	0,0055
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	4,41	0,0060
hsa-miR-335	MIMAT0000765	4,16	0,0268
hsa-miR-29a	MIMAT0000086	4,11	0,0237
hsa-miR-219-5p	MIMAT0000276	4,00	0,0427
hsa-miR-17	MIMAT0000070	3,95	0,0386
hsa-miR-520h/g	MIMAT0002867	3,92	0,0047
hsa-miR-151-5p	MIMAT0004697	3,92	0,0131
hsa-miR-524-5p	MIMAT0002849	3,82	0,0172
hsa-miR-29b	MIMAT0000086	3,77	0,0340
hsa-miR-202*	MIMAT0002810	3,51	0,0231
hsa-miR-9	MIMAT0000441	3,36	0,0074
hsa-miR-150	MIMAT0000451	3,30	0,0394
hsa-miR-15b	MIMAT0000417	3,21	0,0019
hsa-miR-518c	MIMAT0002848	3,20	0,0304
hsa-miR-23a	MIMAT0000078	3,14	0,0003
hsa-miR-19b	MIMAT0000074	3,03	0,0035
hsa-miR-25	MIMAT0004498	3,03	0,0060
hsa-miR-15a	MIMAT0000068	3,02	0,0238
hsa-miR-143	MIMAT0004599	3,00	0,0069
hsa-miR-141	MIMAT0004598	2,77	0,0211
hsa-miR-30d	MIMAT0000245	2,62	0,0315
hsa-miR-627	MIMAT0003296	2,62	0,0207
hsa-miR-26b	MIMAT0000083	2,60	0,0059
hsa-miR-24	MIMAT0000080	2,46	0,0140
hsa-miR-217	MIMAT0000274	2,24	0,0278
hsa-miR-92a	MIMAT0000092	1,83	0,0437
hsa-miR-376b	MIMAT0002172	-1,90	0,0281
hsa-miR-637	MIMAT0003307	-1,90	0,0432
hsa-miR-130b*	MIMAT0004680	-1,95	0,0116
hsa-miR-1537	MIMAT0007399	-1,97	0,0383
hsa-miR-633	MIMAT0003303	-2,01	0,0448
hsa-miR-10a	MIMAT0000253	-2,12	0,0337
hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	-2,23	0,0072
hsa-miR-337-3p	MIMAT0000754	-2,23	0,0319
hsa-miR-575	MIMAT0003240	-2,24	0,0257
hsa-miR-936	MIMAT0004979	-2,25	0,0084
hsa-miR-626	MIMAT0003295	-2,31	0,0361
hsa-miR-1271	MIMAT0005796	-2,38	0,0315
hsa-miR-876-3p	MIMAT0004925	-2,65	0,0023
hsa-miR-639	MIMAT0003309	-2,90	0,0222

Tabla 3. Predictibilidad de cada miARN individual entre los 50 mejores miARN desregulados en CRC. Se muestran los parámetros de la curva de ROC (área bajo la curva (AUC) e intervalo de confianza (IC) del 95 %, y sensibilidad (S) y especificidad (Sp)) correspondientes a un punto de corte óptimo.

5

50 mejores miARN	AUC	IC bajo	IC alto	punto de corte	S	Sp
hsa-miR-302a	0,9143	0,8233	1,0053	0,5195	81	90
hsa-miR-30a	0,9048	0,7992	1,0103	0,5151	86	85
hsa-miR-302b	0,8524	0,7327	0,9720	0,5333	81	80
hsa-miR-565:9.1	0,8905	0,7861	0,9948	0,5262	81	85
hsa-miR-191	0,8667	0,7557	0,9776	0,4503	90	75
hsa-miR-125b	0,8714	0,7429	1,0000	0,5443	86	85
hsa-miR-100	0,8643	0,7381	0,9904	0,5230	86	90
hsa-miR-194	0,8238	0,6885	0,9591	0,4942	86	75
hsa-miR-27a	0,8405	0,7092	0,9717	0,5899	86	80
hsa-miR-424	0,8619	0,7514	0,9725	0,5888	76	80
hsa-miR-125a-5p	0,8500	0,7272	0,9728	0,5901	76	85
hsa-miR-335	0,8310	0,6973	0,9646	0,5494	81	85
hsa-miR-29a	0,8667	0,7435	0,9898	0,5449	81	85
hsa-miR-219-5p	0,8238	0,6967	0,9509	0,5895	76	75
hsa-miR-17	0,8429	0,7185	0,9672	0,4718	81	80

ES 2 662 401 T3

hsa-miR-520h/g	0,8786	0,7724	0,9847	0,5382	81	85
hsa-miR-151-5p	0,8476	0,7183	0,9770	0,4912	90	80
hsa-miR-524-5p	0,8333	0,7023	0,9643	0,5795	76	90
hsa-miR-29b	0,8381	0,7136	0,9626	0,4574	90	75
hsa-miR-202*	0,8405	0,7121	0,9689	0,4558	90	75
hsa-miR-9	0,8381	0,7138	0,9624	0,5730	81	80
hsa-miR-150	0,8429	0,7184	0,9673	0,4537	86	75
hsa-miR-15b	0,8643	0,7507	0,9778	0,5775	81	80
hsa-miR-518c	0,8476	0,7216	0,9737	0,5840	81	85
hsa-miR-23a	0,8905	0,7861	0,9948	0,5799	81	80
hsa-miR-19b	0,8381	0,7016	0,9746	0,6538	81	80
hsa-miR-25	0,8952	0,8028	0,9876	0,5533	81	80
hsa-miR-15a	0,8619	0,7493	0,9745	0,4686	81	75
hsa-miR-143	0,8524	0,7333	0,9714	0,5989	76	85
hsa-miR-141	0,8429	0,7082	0,9776	0,5084	86	85
hsa-miR-30d	0,8226	0,6918	0,9534	0,5176	76	80
hsa-miR-627	0,8333	0,7083	0,9584	0,5961	71	85
hsa-miR-26b	0,8619	0,7505	0,9733	0,5455	90	70
hsa-miR-24	0,8524	0,7292	0,9756	0,4210	90	75
hsa-miR-217	0,8310	0,7035	0,9584	0,5650	67	80
hsa-miR-92a	0,8571	0,7451	0,9692	0,2972	95	65
hsa-miR-376b	0,8262	0,7004	0,9520	0,6884	62	90
hsa-miR-637	0,8595	0,7435	0,9756	0,4911	86	75
hsa-miR-130b*	0,8762	0,7694	0,9830	0,6915	71	95
hsa-miR-1537	0,8524	0,7198	0,9849	0,4172	90	75
hsa-miR-633	0,8595	0,7439	0,9751	0,5986	76	85
hsa-miR-10a	0,8810	0,7764	0,9855	0,4161	86	75
hsa-miR-127-3p	0,8833	0,7744	0,9922	0,5676	81	85
hsa-miR-337-3p	0,8452	0,7222	0,9683	0,5727	71	80
hsa-miR-575	0,8298	0,7015	0,9580	0,6407	76	85
hsa-miR-936	0,8476	0,7249	0,9704	0,5919	71	90
hsa-miR-626	0,8214	0,6928	0,9501	0,6718	71	80
hsa-miR-1271	0,8190	0,6896	0,9485	0,6845	67	85
hsa-miR-876-3p	0,8476	0,7212	0,9741	0,4657	90	75
hsa-miR-639	0,8071	0,6753	0,9390	0,7118	52	95

Tabla 4. Parámetros de cambio en veces y valor de p para los 50 mejores miARN desregulados en AA que muestran los cambios en veces más altos.

50 mejores miARN	n.º de MIMAT	FC	valor de p
hsa-miR-302a	MIMAT0000684	10,37	0,0003
hsa-miR-29a	MIMAT0000086	9,12	0,0001
hsa-miR-152	MIMAT0000438	6,29	0,0002
hsa-miR-518e*	MIMAT0005450	6,12	0,0079
hsa-miR-768-3p:11.0	MI0005117	5,68	0,0048
hsa-miR-335	MIMAT0000765	5,67	0,0112
hsa-miR-17	MIMAT0000070	5,46	0,0069
hsa-miR-30a	MIMAT0000087	4,91	0,0142
hsa-miR-191	MIMAT0000440	4,82	0,0162
hsa-miR-100	MIMAT0000098	4,55	0,0235
hsa-miR-519d	MIMAT0002853.	4,24	0,0277
hsa-miR-199a-5p	MIMAT0000231	4,11	0,0222
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	3,96	0,0219
hsa-miR-424	MIMAT0001341	3,95	0,0174
hsa-miR-18a	MIMAT0000072	3,88	0,0133
hsa-miR-193b	MIMAT0002819	3,80	0,0394
hsa-miR-302a*	MIMAT0000683	3,76	0,0340
hsa-miR-151-5p	MIMAT0004697	3,75	0,0150
hsa-miR-125b	MIMAT0000423	3,75	0,0275
hsa-miR-518c	MIMAT0002848	3,67	0,0159
hsa-miR-130a	MIMAT0000425	3,59	0,0079
hsa-miR-30d	MIMAT0000245	3,58	0,0025
hsa-miR-22	MIMAT0000077	3,27	0,0096

hsa-miR-15a	MIMAT0000068	3,25	0,0133
hsa-miR-192	MIMAT0000222	3,22	0,0404
hsa-miR-484	MIMAT0002174	3,18	0,0067
hsa-miR-522	MIMAT0002868	2,93	0,0394
hsa-miR-423-3p	MIMAT0001340	2,88	0,0367
hsa-miR-217	MIMAT0000274	2,79	0,0056
hsa-miR-664	MIMAT0005949	2,70	0,0252
hsa-miR-30e*	MIMAT0000693	2,63	0,0001
hsa-miR-185	MIMAT0000455	2,59	0,0357
hsa-miR-19b	MIMAT0000074	2,57	0,0321
hsa-miR-1274b	MIMAT0006427	2,55	0,0216
hsa-miR-23a	MIMAT0000078	2,51	0,0047
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	2,48	0,0118
hsa-let-7d	MIMAT0000065	2,47	0,0300
hsa-miR-581	MIMAT0003246	2,46	0,0081
hsa-miR-450b-3p	MIMAT0004910	-2,49	0,0268
hsa-miR-187*	MIMAT0004561	-2,59	0,0002
hsa-miR-576-3p	MIMAT0004796	-2,59	0,0001
hsa-miR-1290	MIMAT0005880	-2,62	0,0005
hsa-miR-380*	MIMAT0000734	-2,66	0,0016
hsa-miR-369-3p	MIMAT0000721	-2,84	0,0190
hsa-miR-876-3p	MIMAT0004925	-3,09	0,0022
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	-3,52	0,0008
hsa-miR-936	MIMAT0004979	-3,55	0,0001
hsa-miR-218	MIMAT0000275	-4,56	0,0122
hsa-miR-379	MIMAT0000733	-5,71	0,0000
hsa-miR-630	MIMAT0003299	-6,29	0,0010

Tabla 5. Predictibilidad de cada miARN individual entre los 50 mejores miARN desregulados en AA. Se muestran los parámetros de la curva de ROC (área bajo la curva (AUC) e intervalo de confianza (IC) del 95 %, y sensibilidad (S) y especificidad (Sp)) correspondientes a un punto de corte óptimo.

5

50 mejores miARN	AUC	IC bajo	IC alto	punto de corte	S	Sp
miR.302a	0,9100	0,8170	1,0030	0,3571	95	80
miR.29a	0,8775	0,7656	0,9894	0,3763	90	80
miR.152	0,875	0,7700	0,9800	0,5804	80	85
miR.518c*	0,7925	0,6551	0,9299	0,5243	65	70
miR.768.3p.11.0	0,8175	0,6888	0,9462	0,4317	80	65
miR.335	0,7925	0,6545	0,9305	0,5461	65	75
miR.17	0,8525	0,7340	0,9710	0,4344	80	75
miR.30a	0,8350	0,7050	0,9650	0,4889	80	80
miR.191	0,8200	0,6888	0,9512	0,5530	75	75
miR.100	0,8300	0,6963	0,9637	0,5106	80	80
miR.519d	0,7925	0,6527	0,9323	0,4689	80	70
miR.199a.5p	0,8050	0,6711	0,9389	0,4913	75	70
miR.125a.5p	0,8225	0,6922	0,9528	0,3773	90	65
miR.424	0,8350	0,7128	0,9572	0,4925	75	70
miR.18a	0,8400	0,7164	0,9636	0,5475	80	80
miR.193b	0,7875	0,6473	0,9277	0,5452	75	75
miR.302a*	0,8200	0,6850	0,9550	0,5003	80	80
miR.151.5p	0,7950	0,6564	0,9336	0,4711	75	70
miR.125b	0,8250	0,6988	0,9512	0,3842	80	70
miR.518c	0,8475	0,7273	0,9677	0,5524	75	70
miR.130a	0,8275	0,6900	0,9650	0,5786	80	85
miR.30d	0,8725	0,7659	0,9791	0,3596	85	70
miR.22	0,8525	0,7310	0,9740	0,5737	75	80
miR.15a	0,8725	0,7654	0,9796	0,4755	80	75
miR.192	0,7800	0,6386	0,9214	0,4435	80	65
miR.484	0,8625	0,7492	0,9758	0,3974	90	70
miR.522	0,7975	0,6613	0,9337	0,5762	70	75
miR.423.3p	0,8150	0,6780	0,9520	0,5520	70	85
miR.217	0,8525	0,7257	0,9793	0,5673	75	95
miR.664	0,8175	0,6715	0,9635	0,5403	80	80

miR.30e*	0,8775	0,7709	0,9841	0,5039	85	80
miR.185	0,8275	0,6976	0,9574	0,6138	65	85
miR.19b	0,8087	0,6746	0,9429	0,4663	80	70
miR.1274b	0,8400	0,7189	0,9611	0,5231	70	75
miR.23a	0,8400	0,7195	0,9605	0,4723	85	70
miR.324.3p	0,8275	0,6976	0,9574	0,5407	80	70
let.7d	0,8025	0,6645	0,9405	0,5203	75	70
miR.581	0,8525	0,7340	0,9710	0,6819	70	90
miR.450b.3p	0,7550	0,6059	0,9041	0,5207	65	70
miR.187*	0,9075	0,8125	1,0025	0,5139	85	85
miR.576.3p	0,9575	0,8941	1,0209	0,4191	90	90
miR.1290	0,8750	0,7669	0,9831	0,4742	85	80
miR.380*	0,8475	0,7156	0,9794	0,5532	75	90
miR.369.3p	0,7925	0,6533	0,9317	0,5663	65	80
miR.876.3p	0,8325	0,7090	0,9560	0,6131	70	80
miR.671.3p	0,8550	0,7393	0,9707	0,5179	65	85
miR.936	0,9225	0,8427	1,0023	0,5084	85	85
miR.218	0,8000	0,6591	0,9409	0,4740	75	70
miR.379	0,9325	0,8519	1,0131	0,5830	85	95
miR.630	0,8375	0,7132	0,9618	0,4579	75	70

Validación de la expresión de miARN plasmáticos mediante qRT-PCR en tiempo real. Los resultados de la expresión de miARN plasmáticos basados en microalineamientos son técnicamente reproducibles. Inicialmente, se realizó una qRT-PCR en tiempo real para confirmar los resultados de microalineamiento en 28 muestras seleccionadas aleatoriamente del conjunto 1 (19 pacientes con neoplasmas colorrectales y 9 controles sanos). Para estos estudios, se seleccionó un total de 14 miARN candidatos. Se seleccionaron doce miARN candidatos (miR17-5p, miR92a, miR19b, miR18a, miR29a, miR302a, miR23a, miR27a, miR24, miR335, miR424 y miR15b) por estar presentes en los 50 mejores miARN desregulados en CRC y/o AA y tener una intensidad de microalineamiento de base logarítmica  $2 > 8$ . Se seleccionaron también dos miARN adicionales (miR19a, y miR20a) por ser parte de la agrupación de miR 17-92, una de las agrupaciones de miARN oncogénicos mejor caracterizadas, aunque no satisfacían los criterios anteriores. Globalmente, se correlacionaron los resultados de qRT-PCR y microalineamiento (datos no mostrados) excepto para miR424 que no mostró ninguna amplificación mediante qRT-PCR y, por tanto, se excluyó del análisis posterior.

Se confirmó que seis microARN plasmáticos se sobreexpresaban en pacientes con CRC de una cohorte independiente. En segundo lugar, se analizaron los 13 miARN candidatos que mostraban amplificación adecuada en la fase anterior (miR92a, miR17-5p, miR18a, miR19a, miR19b, miR20a, miR15b, miR29a, miR302a, miR23a, miR27a, miR24 y miR335) en plasma de un conjunto independiente de 42 pacientes con CRC y 53 controles sanos, para validar los resultados mediante qRT-PCR en tiempo real.

De manera interesante, se confirmó que miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a y miR335 se regulaban por incremento significativamente en pacientes con CRC (figura 3). Además, miR-24 también se sobreexpresaba en este grupo de pacientes, pero sin alcanzar significación estadística ( $p = 0,08$ ). Notablemente, los miARN validados en este segundo conjunto también demostraron una alta precisión en la discriminación de CRC de controles sanos con áreas bajo la curva de ROC (AUC) que oscilaban entre 0,8 (IC del 95 %: 0,71-0,89) y 0,7 (IC del 95 %: 0,59-0,80). A continuación, se buscó observar si cualquier combinación de estos miARN podría mejorar la precisión de discriminación en la detección de CRC con respecto a cada uno de ellos solos. Entre las combinaciones que mostraban la mejor capacidad de discriminación destacaban las firmas miR19a + miR19b, y miR19a + miR19b + miR15b (tabla 6; figura 4). Finalmente, se exploró la capacidad de predicción de estas firmas en pacientes con CRC en fase inicial (TNM I-II) y avanzada (TNMIII-IV). Tal como se expone en la tabla 2, ambas firmas mostraron una alta precisión de discriminación tanto en casos iniciales como en casos avanzados. De manera similar, se examinó si estas firmas también eran capaces de detectar tumores de lado derecho de manera tan precisa como los de lado izquierdo, y fue el caso para ambos (tabla 2).

Tabla 6. Predictibilidad de las mejores firmas de miARN plasmáticos en pacientes con CRC del conjunto 2.

FIRMAS:	miR19a+miR19b	miR19a+miR19b+miR15b
Todos los CRC (n = 42)		
AUC (IC del 95 %)	0,82 (0,73-0,90)	0,84 (0,76-0,92)
Sensibilidad	78,57	78,57
Especificidad	77,36	79,25
TNM I/II (n = 21)		
AUC (IC del 95 %)	0,85 (0,75-0,96)	0,87 (0,71-0,92)
Sensibilidad	71,43	80,95

Especificidad	92,45	79,25
TNM III/IV (n = 21)		
AUC (IC del 95 %)	0,81 (0,71-0,92)	0,81 (0,70-0,92)
Sensibilidad	85,71	76,19
Especificidad	71,70	77,36
Lado derecho (n = 14)		
AUC (IC del 95 %)	0,82 (0,71-0,92)	0,84 (0,73-0,94)
Sensibilidad	85,71	85,71
Especificidad	79,25	79,25
Lado izquierdo (n = 28)		
AUC (IC del 95 %)	0,8 (0,71-0,90)	0,83 (0,73-0,92)
Sensibilidad	82,14	75,47
Especificidad	78,57	79,25

Se muestran los parámetros de la curva de ROC (área bajo la curva (AUC) e intervalo de confianza (IC) del 95 % para todos los casos de CRC, así como para diferentes estadios tumorales (I/II y III/IV) y ubicaciones (derecha e izquierda, con respecto al ángulo esplénico del colon)).

5 Se confirmó que un microARN plasmático estaba aumentado en pacientes con adenomas colorrectales avanzados. Con el fin de evaluar si cualquiera de los miARN plasmáticos que se encontró que se sobreexpresaban en ambos conjuntos de pacientes con CRC también estaban aumentados en pacientes que albergaban lesiones precursoras de cáncer, que se analizaron mediante qRT-PCR en tiempo real en muestras de plasma de una cohorte independiente de 40 pacientes con AA y 53 controles sanos. Se confirmó que el miR18a se sobreexpresaba significativamente en este segundo conjunto de pacientes con AA en comparación con los controles, ya que estaba en el primer conjunto (figura 1B). Sin embargo, aunque este miARN mostró una buena capacidad de discriminación en el primer conjunto de pacientes con AA (AUC: 0,84, IC del 95 %: 0,72-0,96, S: 80 %, Sp: 80 %), este parámetro era menor en el segundo conjunto de pacientes (AUC: 0,64, IC del 95 %: 0,52-0,75, S: 72 %, Sp: 57 %).

15 En este estudio, los inventores realizaron la obtención del perfil de miARN en todo el genoma mediante microalineamientos en muestras de plasma de pacientes con CRC o AA, e individuos sanos. Estos resultados muestran que la expresión de miARN plasmáticos puede discriminar entre pacientes con neoplasia colorrectal y sujetos de control, lo que sugiere su posible valor para la detección no invasiva de estas lesiones. En lo que respecta al conocimiento de los inventores, este es el primer informe que analiza la expresión en todo el genoma de miARN plasmáticos en pacientes con CRC y AA mediante una tecnología de alto rendimiento y, después, validando los resultados en una cohorte externa, independiente. Basándose en este análisis de alto rendimiento, se ha identificado un gran número de supuestos biomarcadores de miARN plasmáticos útiles para detectar pacientes que albergan CRC o AA. Además, se ha confirmado la alta capacidad de discriminación entre CRC e individuos sanos de seis microARN plasmáticos en una cohorte diferente y usando una tecnología diferente. Merece la pena mencionar que cinco de estos miARN (es decir, miR19a, miR19b, miR18a, miR15b, y miR335) representan biomarcadores nuevos, no notificados anteriormente.

30 El reciente descubrimiento de miARN estables en plasma y otros fluidos ha abierto la posibilidad de usar estas moléculas como biomarcadores de enfermedad, y varios estudios han evaluado esta estrategia en diferentes entornos. En cáncer humano, este enfoque es realmente prometedor porque el análisis de miARN circulantes relacionados con tumores probablemente sería capaz de detectar neoplasia de un modo no invasivo. Sin embargo, mientras que la mayor parte de los estudios de obtención del perfil de expresión de miARN en cáncer se han realizado usando muestras de tejidos, solo un número limitado de ellos se han centrado en el posible valor de miARN circulantes en el diagnóstico y pronóstico [21-23]. Notablemente, el uso de miARN como biomarcadores parece ser una estrategia mejor que marcadores de ARN o proteína debido a la alta estabilidad de estas moléculas, incluso en presencia de ARNasas [23].

40 Hasta ahora, solo algunos estudios han analizado la expresión de algunos miARN plasmáticos candidatos en CRC. Inicialmente, Ng *et al.* encontraron mediante análisis de qRT-PCR que dos miARN plasmáticos (es decir, miR17-3p, y miR92a) estaban significativamente elevados en pacientes con CRC en comparación con sujetos de control. Sin embargo, su análisis inicial se limitó a 95 miARN en 10 muestras de plasma (cinco pacientes con CRC y cinco individuos sanos). Más importante, este estudio solo evaluó la posible utilidad de miARN plasmáticos en el diagnóstico de CRC, pero no en la identificación de lesiones precursoras [24]. Poco después, Huang *et al.* notificaron la posible utilidad de 2 miARN plasmáticos, miR29a y miR92a, para detectar pacientes tanto con CRC como con AA. Sin embargo, este análisis de qRT-PCR se limitó a 12 miARN seleccionados basándose en los informes previos. Pu *et al.* analizaron mediante qRT-PCR la expresión de tres miARN en muestras de plasma de pacientes con CRC notificando una sobreexpresión significativa de miR221, pero no se incluyeron pacientes con AA en este estudio [25]. Por último, Cheng *et al.* notificaron una regulación por incremento significativa de niveles plasmáticos de miR141 en 50 pacientes metastásicos con CRC tras analizar la expresión de tres miARN [26].

El estudio era para realizar una obtención del perfil completo de miARN circulantes usando tecnología de alto

rendimiento en pacientes con CRC y AA, con el fin de identificar los miARN plasmáticos con posible utilidad como biomarcadores para el diagnóstico de pacientes con estas lesiones. Entre los 743 miARN analizados, se encontraron 95 miARN circulantes significativamente desregulados en pacientes con CRC, y 125 en pacientes con AA, mostrando algunos de ellos una buena capacidad de discriminación. Es importante mencionar que entre los miARN regulados por incremento de manera significativa en los análisis de microalineamiento, los presentes inventores no solo confirmaron los miARN plasmáticos relacionados con CRC en estudios previos, tales como miR29a, miR92a y miR141, sino que también notificaron nuevos miARN candidatos con posible implicación en la carcinogénesis de CRC. Además, entre estos miARN sobreexpresados, se encontraron todos los miembros de la agrupación de miR17-92 (miR17, miR92a, miR19a, miR19b, miR18a, y miR20a) y dos miembros de la agrupación de miR106b-25 (miR-25 y miR93), una agrupación caracterizada de manera menos extensa paróloga a miR17-92 en mamíferos. Estos hallazgos destacan la agrupación de miR17-92 como un actor central en la carcinogénesis colorrectal. La agrupación de miR17-92, también denominada oncomiR1, es una de las agrupaciones de miARN oncogénicos mejor caracterizadas [27,28]. En ese sentido, se ha sugerido que el aumento en la inestabilidad cromosómica, responsable de la progresión de adenoma a adenocarcinoma, no solo conduce a regulación por incremento de oncogenes, sino que también provoca sobreexpresión de miARN críticos, incluyendo la agrupación de miR17-92 [29].

Los presentes inventores demostraron que algunos de los miARN regulados por incremento en el primer conjunto de pacientes con CRC (es decir, miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a y miR335) también se sobreexpresaban en una cohorte independiente. Notablemente, estos miARN validados mostraron una alta precisión de discriminación para CRC y varias combinaciones de estos miARN mejoraron la capacidad de discriminación de cualquiera de estos miARN solos. Además, fueron capaces de detectar CRC incipiente (I-II) de manera tan precisa como CRC avanzado (estadio II-III), así como tumores de lado derecho de manera tan precisa como lesiones de lado izquierdo. Estos resultados apuntan a la posible utilidad de estos miARN plasmáticos como nuevos biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de CRC.

Respecto a lesiones precursoras de cáncer colorrectal, se encontró que solo uno de los seis miARN sobreexpresados en CRC (miR-18a) se confirmó que se sobreexpresaba significativamente en las dos cohortes independientes de pacientes con AA. Aunque miR-18a mostró una capacidad de discriminación bastante buena en el primer conjunto de pacientes, esta capacidad era moderada en la segunda cohorte. De hecho, en la cohorte de pacientes con AA analizados por Huang *et al.* dos miR plasmáticos (miR-29a y miR-92a) mostraron una precisión bastante buena en la discriminación de AA de los controles [16]. Estos dos miARN plasmáticos también se sobreexpresaban significativamente en la primera cohorte de pacientes con AA, pero no en el segundo conjunto. Una posible explicación de esta discrepancia entre ambos conjuntos de pacientes podrían ser las características menos avanzadas de AA en las segundas cohortes de pacientes (tabla 1). Conjuntamente, estos resultados indican que la evaluación de la utilidad de microARN plasmáticos en pacientes con AA constituye una línea de investigación interesante y merece investigación adicional. Actualmente, la detección de AA sigue siendo un desafío importante para estrategias de examen de CRC no invasivas. Efectivamente, merece la pena mencionar que pruebas inmunoquímicas fecales, una estrategia aceptada actualmente para el examen de CRC no invasivo en la población de riesgo promedio, muestra un buen rendimiento para el diagnóstico de CRC, pero pasa por alto casi el 50 % de AA, tal como se ha demostrado recientemente en un estudio del presente grupo [12].

De manera interesante, se ha notificado previamente que todos los miARN validados en este estudio se sobreexpresan en muestras de tejidos de pacientes con CRC [30-34]. Por consiguiente, puede plantearse la hipótesis de que CRC constituye la fuente de estos miARN plasmáticos. Por tanto, los resultados no solo apuntan a miR29a, miR15b, miR19a, miR-19b, miR-18a y miR-335 como potentes biomarcadores para el diagnóstico de CRC, sino que también destacan su implicación en la carcinogénesis colorrectal. Además, considerando el posible papel oncogénico de estos miARN, los resultados abren la posibilidad de un futuro diseño de nuevos tratamientos dirigidos centrados en la inhibición de estas moléculas.

Además de los microARN enumerados y las familias de microARN, pueden añadirse otros microARN para potenciar la detección del cáncer colorrectal. Por ejemplo, el método puede comprender además la determinación del nivel de expresión de microARN que están infraexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;
hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;

hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;
hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;
hsa-miR-936;
hsa-miR-379;
hsa-miR-664*;
hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*;
hsa-miR-515-3p.

el método puede comprender además la determinación del nivel de expresión de microARN que están sobreexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;
hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p:11.0;
hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a;
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;
hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;
hsa-miR-25;
hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*;
hsa-miR-921.

5 Aún otra biofirma o ensayo incluirá la combinación de microARN tanto sobre como infraexpresados, por ejemplo, a partir de los enumerados anteriormente en el presente documento o divulgados en el presente documento. Como tal, la presente invención también incluye en un aspecto la combinación de microARN tanto sobre como infraexpresados a partir de microARN respectivos, con o sin los microARN enumerados específicos y las familias de microARN (o coexpresados).

10

En resumen, los pacientes con CRC y AA muestran perfiles de miARN plasmáticos significativamente diferentes en comparación con individuos sanos. Estos miARN circulantes relacionados con tumores constituyen biomarcadores nuevos y representan una posible estrategia para un diagnóstico temprano, no invasivo. En este estudio, se

identifican seis miARN plasmáticos candidatos prometedores para la detección de CRC. No obstante, este enfoque debe validarse adicionalmente en cohortes más grandes de pacientes con el fin de evaluar su eficacia y posible aplicabilidad en un entorno de examen.

5 Se contempla que cualquier realización comentada en esta memoria descriptiva pueda implementarse con respecto a cualquier método, kit, reactivos o composición de la invención, y viceversa. Además, pueden usarse las composiciones de la invención para lograr los métodos de la invención.

10 Se entenderá que se muestran las realizaciones particulares descritas en el presente documento a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de esta invención pueden emplearse en diversas realizaciones sin salirse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que experimentación de rutina, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en el presente documento. Se considera que tales equivalentes están dentro del alcance de esta invención y están cubiertos por las reivindicaciones.

15 Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de destreza de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan en el presente documento como referencia en el mismo grado como si se indicara específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpore como referencia.

20 El uso de la palabra “un” o “una” cuando se usa conjuntamente con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno”, pero también es coherente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”. El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa con el significado de “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas solo o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere a solo alternativas e “y/o”. En toda esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

25 Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en la(s) reivindicación/reivindicaciones, las palabras “que comprende” (y cualquier forma de comprender, tal como “comprenden” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de tener, tal como “tienen” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de incluir, tal como “incluyen” e “incluye”) o “que contiene” (y cualquier forma de contener, tal como “contiene” y “contienen”) son inclusivas o de extremos abiertos y no excluyen etapas del método o elementos no mencionados, adicionales. Tal como se usa en el presente documento, la frase “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a las etapas o materiales especificados y los que no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y nueva(s) de la invención reivindicada. Tal como se usa en el presente documento, la frase “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o componente no especificado en la reivindicación excepto por, por ejemplo, impurezas asociadas habitualmente con el elemento o limitación. El término “o combinaciones de los mismos” tal como se usa en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, “A, B, C, o combinaciones de los mismos” se pretende que incluya al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC, o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC, o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así en adelante. El experto en la técnica entenderá que normalmente no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que resulte evidente de otro modo a partir del contexto.

30 Tal como se usa en el presente documento, palabras de aproximación tales como, sin limitación, “aproximadamente”, “sustancial” o “sustancialmente” se refieren a una condición de que cuando está así modificada se entiende que no es necesariamente absoluta o perfecta, sino que se consideraría suficientemente próxima como para que los expertos habituales en la técnica justifiquen que la designación de la condición está presente. El grado en el que la descripción puede variar dependerá del tamaño del cambio que puede instituirse y que todavía un experto habitual en la técnica reconozca que el rasgo modificado tiene todavía las características y capacidades requeridas del rasgo no modificado. En general, pero sujeto a la discusión anterior, un valor numérico en el presente documento que está modificado por una palabra de aproximación tal como “aproximadamente” puede variar a partir del valor establecido en al menos  $\pm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12$  o  $15\%$ .

35 Todas las composiciones y/o métodos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y/o los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Se considera que todos los sustitutos y modificaciones similares de este tipo evidentes para los expertos en la técnica están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

65

**Bibliografía**

1. Esquela-Kerscher, A. y Slack, F.J. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 259-69.
- 5 2. Calin, G.A. y Croce, C.M. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 6, 857-66.
3. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R. y Golub, T.R. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435, 834-8.
- 10 4. Schetter, A.J., Leung, S.Y., Sohn, J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N., Yuen, S.T., Chan, T.L., Kwong, D.L., Au, G.K., Liu, C.G., Calin, G.A., Croce, C.M. y Harris, C.C. (2008) MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*, 299, 425-36.
- 15 5. Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agedjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B. y Tewari, M. (2008) Circulating microRNAs as stable blood based markers for cancer detection. *ProcNatlAcad Sei USA*, 105, 10513-8.
- 20 6. Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholakh, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y. y Chajut, A. (2008) Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*, 3, e3148.
- 25 7. Chim, S.S., Shing, T.K., Hung, E.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W. y Lo, Y.M. (2008) Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*, 54, 482-90.
8. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J. y Thun, M.J. (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 59, 225-49.
- 30 9. Gellad, Z.F. y Provenzale, D. Colorectal cancer: national and international perspective on the burden of disease and public health impact. *Gastroenterology*, 138, 2177-90.
- 35 10. Hoff, G. y Dornitz, J.A. Contrasting US and European approaches to colorectal cancer screening: which is best? *Gut*, 59,407-14.
11. Whitlock, E.P., Lin, J.S., Liles, E., Beil, T.L. y Fu, R. (2008) Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 149, 638-58.
- 40 12. Quintero, E., Castells, A., Bujanda, L., Cubiella, J., Salas, D., Lanas, A., Andreu, M., Carballo, F., Morillas, J.D., Hernandez, C., Jover, R., Montalvo, I., Arenas, J., Laredo, E., Hernandez, V., Iglesias, F., Cid, E., Zubizarreta, R., Sala, T., Ponce, M., Andres, M., Teruel, G., Peris, A., Roneales, M.P., Polo-Tomas, M., Bessa, X., Ferrer-Armengou, O., Grau, J., Serradesanferm, A., Ono, A., Cruzado, J., Perez-Riquelme, F., Alonso-Abreu, I., de la Vega-Prieto, M., Reyes-Melian, J.M., Cacho, G., Diaz-Tasende, J., Herreros-de-Tejada, A., Poves, C., Santander, C. y Gonzalez-Navarro, A. Colonoscopy versus fecal immunochemical testing in colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*, 366, 697-706.
- 45 13. Cunningham, J.M., Oberg, A.L., Borralho, P.M., Kren, B.T., French, A.J., Wang, L., Bot, B.M., Morlan, B.W., Silverstein, K.A., Staggs, R., Zeng, Y., Lamblin, A.F., Hilker, C.A., Fan, J.B., Steer, C.J. y Thibodeau, S.N. (2009) Evaluation of a new high-dimensional miARN profiling platform. *BMC Med Genomics*, 2, 57.
- 50 14. Chen, J., Lozach, J., Garcia, E.W., Barnes, B., Luo, S., Mikoulitch, I., Zhou, L., Schroth, G. y Fan, J.B. (2008) Highly sensitive and specific microRNA expression profiling using BeadArray technology. *Nucleic Acids Res*, 36, e87.
- 55 15. Du, P., Kibbe, W.A. y Lin, S.M. (2008) lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics*, 24, 1547-8.
16. Huang, Z., Huang, D., Ni, S., Peng, Z., Sheng, W. y Du, X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*, 127, 118-26.
- 60 17. Chang, K.H., Mestdagh, P., Vandesompele, J., Kerin, M.J. y Miller, N. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 10, 173.
18. Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 3, Article3.
- 65 19. Culhane, A.C., Thioulouse, J., Perriere, G. y Higgins, D.G. (2005) MADE4: an R package for multivariate analysis

of gene expression data. *Bioinformatics*, 21, 2789-90.

20. Sabates-Bellver, J., Van der Flier, L.G., de Palo, M., Cattaneo, E., Maake, C., Rehrauer, H., Laczko, E., Kurowski, M.A., Bujnicki, J.M., Menigatti, M., Luz, J., Ranalli, T.V., Gomes, V., Pastorelli, A., Faggiani, R., Anti, M., Jiricny, J., Clevers, H. y Marra, G. (2007) Transcriptome profile of human colorectal adenomas. *Mol Cancer Res*, 5, 1263-75.
21. Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boultonwood, J., Wainscoat, J.S., Hatton, C.S. y Harris, A.L. (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 141, 672-5.
22. Wong, T.S., Liu, X.B., Wong, B.Y., Ng, R.W., Yuen, A.P. y Wei, W.I. (2008) Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*, 14, 2588-92.
23. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Zen, K. y Zhang, C.Y. (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18, 997-1006.
24. Ng, E.K., Chong, W.W., Jin, H., Lam, E.K., Shin, V.Y., Yu, J., Poon, T.C., Ng, S.S. y Sung, J.J. (2009) Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 58, 1375-81.
25. Pu, X.X., Huang, G.L., Guo, H.Q., Guo, C.C., Li, H., Ye, S., Ling, S., Jiang, L., Tian, Y. y Lin, T.Y. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *J Gastroenterol Hepatol*, 25, 1674-80.
26. Cheng, H., Zhang, L., Cogdell, D.E., Zheng, H., Schetter, A.J., Nykter, M., Harris, C.C., Chen, K., Hamilton, S.R. y Zhang, W. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarcador for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One*, 6, e17745.
27. Mendell, J.T. (2008) miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*, 133, 217-22.
28. Olive, V., Jiang, I. y He, L. mir-17-92, a cluster of miRNA in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 1348-54.
29. Diosdado, B., van de Wiel, M.A., Terhaar Sive Droste, J.S., Mongera, S., Postma, C., Meijerink, W.J., Carvalho, B. y Meijer, G.A. (2009) MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression. *Br J Cancer*, 101, 707-14.
30. Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C. y Croce, C.M. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 2257-61.
31. Monzo, M., Navarro, A., Bandres, E., Artells, R., Moreno, I., Gel, B., Ibeas, R., Moreno, J., Martinez, F., Diaz, T., Martinez, A., Balague, O. y Garcia-Foncillas, J. (2008) Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res*, 18, 823-33.
32. Lanza, G., Ferracin, M., Gafa, R., Veronese, A., Spizzo, R., Pichiorri, F., Liu, C.G., Calin, G.A., Croce, C.M. y Negrini, M. (2007) mRNA/microRNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer. *Mol Cancer*, 6, 54.
33. Motoyama, K., Inoue, H., Takatsuno, Y., Tanaka, F., Mimori, K., Uetake, H., Sugihara, K. y Mori, M. (2009) Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *Int J Oncol*, 34, 1069-75.
34. Earle, J.S., Luthra, R., Romans, A., Abraham, R., Ensor, J., Yao, H. y Hamilton, S.R. Association of microRNA expression with microsatellite instability status in colorectal adenocarcinoma. *J Mol Diagn*, 12, 433-40.

La presente divulgación también comprende los siguientes puntos:

1. Un método para diagnosticar o detectar neoplasia colorrectal en un sujeto humano que comprende las etapas de:
  - obtener una o más muestras biológicas del sujeto que se sospecha que padece neoplasia colorrectal;
  - medir un patrón o nivel de expresión global de uno o más microARN obtenidos de la una o más muestras biológicas

del sujeto; y

- 5 comparar el patrón de expresión global del uno o más microARN de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece neoplasia colorrectal con el patrón de expresión global del uno o más microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece neoplasia colorrectal, en el que la sobreexpresión de una combinación de miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b y miR15b es indicativa de cáncer colorrectal.
- 10 2. El método del punto 1, que comprende además el análisis de al menos uno de miR18a, miR29a, o miR335 en comparación con la expresión del sujeto normal, en el que la sobreexpresión de miR18a, miR29a, o miR335 es indicativa de neoplasia colorrectal.
3. El método del punto 1, que comprende además el análisis de al menos uno de miR29a, miR92a, o miR141.
- 15 4. El método del punto 1, en el que la una o más muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en uno o más fluidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra fecal.
- 20 5. El método del punto 1, en el que el método es capaz de detectar CRC incipiente (I-II) de manera tan precisa como CRC avanzado (estadio II-III), tumores de lado derecho y lesiones de lado izquierdo.
6. El método del punto 1, en el que el método comprende un intervalo de confianza que es del 90, el 91, el 92, el 93, el 94 o el 95 % o mayor.
- 25 7. El método del punto 1, en el que el método comprende además determinar el nivel de expresión de microARN que están infraexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;
hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;
hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;
hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;
hsa-miR-936;
hsa-miR-379;
hsa-miR-664*;
hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*;
hsa-miR-515-3p.

- 30 8. El método del punto 1, en el que el método comprende además determinar el nivel de expresión de microARN que están sobreexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;

hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p:11.0;
hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a;
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;
hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;
hsa-miR-25;
hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*;
hsa-miR-921.

5 9. El método del punto 1, en el que el nivel de expresión del uno o más microARN se mide mediante la obtención del perfil de expresión de microalineamiento, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR de transcriptasa inversa en tiempo real, PCR cuantitativa en tiempo real, PCR de punto final, PCR múltiple de punto final, PCR fría, PCR helada, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación múltiple *in situ* o secuenciación de ácidos nucleicos.

10 10. El método del punto 1, en el que el método se usa para tratar un paciente en riesgo o que padece neoplasia colorrectal, seleccionar una terapia de agente antineoplásico para un paciente en riesgo o que padece neoplasia colorrectal, estratificar un paciente en un subgrupo de neoplasia colorrectal o para un ensayo clínico de terapia de neoplasia colorrectal, determinar la resistencia o receptividad a un régimen terapéutico de neoplasia colorrectal, desarrollar un kit para el diagnóstico de neoplasia colorrectal o cualquier combinación de los mismos.

15 11. El método del punto 1, en el que el patrón o nivel de expresión global de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 microARN se selecciona de las tablas 2, 3, 4, y 5, en el que los microARN aumentan la especificidad de la determinación, diagnóstico o detección de neoplasia colorrectal.

20 12. El método del punto 1, que comprende además la etapa de usar el patrón o nivel de expresión global de microARN para el pronóstico, guía de tratamiento o monitorización de la respuesta al tratamiento de la neoplasia colorrectal.

25 13. Un biomarcador para la progresión de la enfermedad de neoplasia colorrectal, metástasis o ambas en el que el biomarcador comprende uno o más microARN y un cambio en la expresión global de uno o más microARN en células de neoplasia colorrectal obtenidas de un paciente es indicativo de progresión de la enfermedad de neoplasia colorrectal en comparación con la expresión global de la expresión del uno o más microARN en células de neoplasia colorrectal normales o células de neoplasia colorrectal obtenidas en un punto de tiempo anterior del mismo paciente, en el que la sobreexpresión de la combinación de miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b y miR15b, es indicativa de cáncer colorrectal.

30 14. El biomarcador del punto 13, que comprende además el análisis de uno o más de los siguientes microARN miR29a, miR92a, miR141, miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a o miR335.

15. El biomarcador del punto 13, en el que el biomarcador comprende además microARN que están infraexpresados en neoplasia colorrectal seleccionados de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;

hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;
hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;
hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;
hsa-miR-936;
hsa-miR-379;
hsa-miR-664*;
hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*;
hsa-miR-515-3p.

16. El biomarcador del punto 13, en el que el biomarcador comprende además microARN que están sobreexpresados en neoplasia colorrectal seleccionados de:

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;
hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p:11.0;
hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a;
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;
hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;
hsa-miR-25;
hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*;
hsa-miR-921.

17. El biomarcador del punto 13, en el que los microARN están infraexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;
hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;
hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;
hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;
hsa-miR-936;
hsa-miR-379;
hsa-miR-664*;
hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*; y
hsa-miR-515-3p.

5  
18. El biomarcador del punto 13, en el que los microARN están sobreexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;
hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p:11.0;
hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a;
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;
hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;

hsa-miR-25;
hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*;
hsa-miR-921.

19. El biomarcador del punto 13, en el que las muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en uno o más fluidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra fecal.
- 5
20. El biomarcador del punto 13, en el que el método es capaz de detectar CRC incipiente (I-II) de manera tan precisa como CRC avanzado (estadio II-III), tumores de lado derecho y lesiones de lado izquierdo.
- 10
21. El biomarcador del punto 13, que comprende además la detección y el análisis del patrón o nivel de expresión de expresión para 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 microARN para diagnosticar o detectar neoplasia colorrectal seleccionados de los microARN de las tablas 2, 3, 4 y 5.
22. Un kit para un diagnóstico de neoplasia colorrectal que comprende:
- 15
- reactivos de detección de biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial en el que la sobreexpresión de una combinación de los microARN miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b y miR15b es indicativa de neoplasia colorrectal, en el que un intervalo de confianza para cáncer colorrectal es del 90 % o mayor.
- 20
23. El kit del punto 22, que comprende además reactivos para la detección y el análisis de al menos uno de miR18a, miR29a, o miR335.
24. El kit del punto 22, que comprende además reactivos para la detección y el análisis de al menos uno de miR29a, miR92a o miR141.
- 25
25. El kit del punto 22, que comprende además instrucciones para el uso en el diagnóstico del riesgo de neoplasia colorrectal, en el que las instrucciones comprenden indicaciones etapa por etapa para comparar el nivel de expresión de los microARN, cuando se mide la expresión de una muestra obtenida de un sujeto que se sospecha que tiene neoplasia colorrectal con el nivel de expresión de una muestra obtenida de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece neoplasia colorrectal.
- 30
26. El kit del punto 22, que comprende además herramientas, recipientes y reactivos necesarios para obtener muestras de un sujeto seleccionadas del grupo que consiste en uno o más fluidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra fecal.
- 35
27. El kit del punto 22, que comprende además reactivos para el análisis de microARN que están infraexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;
hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;
hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;

hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;
hsa-miR-936;
hsa-miR-379;
hsa-miR-664*;
hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*;
hsa-miR-515-3p.

28. El kit del punto 22, que comprende además reactivos para el análisis de microARN que están sobreexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;
hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p:11.0;
hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a;
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;
hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;
hsa-miR-25;
hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*;
hsa-miR-921.

5 29. El kit del punto 22, en el que el patrón o nivel de expresión global de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 microARN se determina para diagnosticar o detectar neoplasia colorrectal.

10 30. Un método para seleccionar una terapia contra el cáncer para un paciente al que se le ha diagnosticado neoplasia colorrectal, comprendiendo el método:

obtener una muestra de un sujeto que tiene una neoplasia colorrectal; y

15 determinar el nivel de expresión de miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a y miR335 en comparación con el nivel de expresión de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece neoplasia colorrectal, en el que la sobreexpresión de los microARN es indicativa de cáncer colorrectal; y

seleccionar la terapia contra el cáncer basándose en la determinación de la neoplasia colorrectal en el paciente.

20 31. Un método para realizar un ensayo clínico para evaluar un fármaco candidato que se cree que es útil en el tratamiento de un estado patológico, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de microARN obtenidos de un conjunto de pacientes, en el que los microARN se seleccionan de uno o más microARN seleccionados de: miR19a y miR19b, o microARN miR19a y miR19b y miR15b;

(b) administrar un fármaco candidato a un primer subconjunto de los pacientes, y

un placebo a un segundo subconjunto de los pacientes;

un fármaco comparativo a un segundo subconjunto de los pacientes; o

una combinación de fármacos del fármaco candidato y otro agente activo a un segundo subconjunto de pacientes;

(c) repetir la etapa (a) tras la administración del fármaco candidato o el placebo, el fármaco comparativo o la combinación de fármacos; y

(d) determinar si el fármaco candidato reduce el número de células neoplásicas colorrectales que tienen un cambio en la expresión de los microARN que es estadísticamente significativa en comparación con cualquier cambio que se produce en el segundo subconjunto de pacientes, en el que una reducción estadísticamente significativa indica que el fármaco candidato es útil en el tratamiento de dicho estado patológico.

32. Un método para diagnosticar o detectar neoplasia colorrectal en un sujeto humano que comprende las etapas de:

identificar el sujeto humano que padece o se sospecha que padece neoplasia colorrectal;

obtener una o más muestras biológicas del sujeto, en el que las muestras biológicas se seleccionan de uno o más fluidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra fecal;

medir un patrón o nivel de expresión global de miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a y miR335; y

comparar el patrón de expresión global del uno o más microARN de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece neoplasia colorrectal con el patrón de expresión global del uno o más microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece neoplasia colorrectal, en el que la sobreexpresión de microARN: miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a y miR335, es indicativa de cáncer colorrectal.

33. El método del punto 32, en el que los microARN están infraexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-636;
hsa-miR-876-3p;
hsa-miR-1537;
hsa-miR-630;
hsa-miR-380*;
hsa-miR-338-5p;
hsa-miR-573;
hsa-miR-182*;
hsa-miR-518c*;
hsa-miR-187*;
hsa-miR-1233;
hsa-miR-449b;
hsa-miR-1204;
hsa-miR-518d-3p;
hsa-miR-1290;
hsa-miR-144:9.1;
hsa-miR-105;
hsa-miR-298;
hsa-miR-491-5p;
hsa-miR-576-3p;
hsa-miR-590-3p;
hsa-miR-1257;
hsa-miR-1225-3p;
hsa-miR-127-3p;
hsa-miR-936;
hsa-miR-379;
hsa-miR-664*;

hsa-miR-548j;
hsa-miR-130b*; y
hsa-miR-515-3p.

34. El método del punto 32, en el que los microARN están sobreexpresados en neoplasia colorrectal y se seleccionan de:

hsa-miR-302b;
hsa-miR-125a-5p;
hsa-miR-424;
hsa-miR-125b;
hsa-miR-100;
hsa-miR-768-3p;11.0;
hsa-miR-24;
hsa-miR-23a;
hsa-miR-1274b;
hsa-miR-27a,
hsa-miR-26b;
hsa-miR-30d;
hsa-miR-520h;
hsa-miR-520g;
hsa-miR-302 <sup>a</sup> ;
hsa-miR-518c;
hsa-miR-335;
hsa-miR-29a;
hsa-miR-152;
hsa-miR-191;
hsa-miR-17;
hsa-miR-19b;
hsa-miR-30a;
hsa-miR-151-5p;
hsa-miR-92a;
hsa-miR-25;
hsa-miR-15b;
hsa-miR-15a;
hsa-miR-30e*;
hsa-miR-132*; y
hsa-miR-921.

5 35. El método del punto 32, en el que el nivel de expresión del uno o más microARN se mide mediante la obtención del perfil de expresión de microalineamiento, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR de transcriptasa inversa en tiempo real, PCR cuantitativa en tiempo real, PCR de punto final, PCR múltiple de punto final, PCR fría, PCR helada, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación múltiple *in situ* o secuenciación de ácidos nucleicos.

10 36. El método del punto 32, en el que el método se usa para tratar un paciente en riesgo o que padece neoplasia colorrectal, seleccionar una terapia de agente antineoplásico para un paciente en riesgo o que padece neoplasia colorrectal, estratificar un paciente en un subgrupo de neoplasia colorrectal o para un ensayo clínico de terapia de neoplasia colorrectal, determinar la resistencia o receptividad a un régimen terapéutico de neoplasia colorrectal,

15 desarrollar un kit para el diagnóstico de neoplasia colorrectal o cualquier combinación de los mismos.

37. El método del punto 32, en el que el patrón o nivel de expresión global de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 microARN se determina para diagnosticar o detectar neoplasia colorrectal.

## REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar o detectar adenomas colorrectales avanzados en un sujeto humano que comprende las etapas de:
- 5 medir un patrón o nivel de expresión global de uno o más microARN obtenidos de una o más muestras biológicas del sujeto, en el que al menos uno de esos microARN es miR18a; y
- 10 comparar el patrón de expresión global del uno o más microARN de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece adenomas colorrectales avanzados con el patrón de expresión global del uno o más microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece adenomas colorrectales avanzados, y en el que la sobreexpresión de miR18a es indicativa de adenomas colorrectales avanzados.
- 15 2. Método para diagnosticar o detectar adenomas colorrectales avanzados y neoplasia colorrectal en un sujeto humano que comprende las etapas de:
- 20 medir un patrón o nivel de expresión global de microARN obtenidos de una o más muestras biológicas del sujeto, en el que al menos esos miARN son miR18a y miR19a y miR19b, o miR18a y miR19a y miR19b y miR156; y
- 25 comparar el patrón de expresión global de microARN de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece adenomas colorrectales avanzados o neoplasia colorrectal con el patrón de expresión global de los microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece adenomas colorrectales avanzados o neoplasia colorrectal, en el que la sobreexpresión de miR18a es indicativa de adenomas colorrectales avanzados y en el que la sobreexpresión de miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b y miR15b es indicativa de neoplasia colorrectal.
- 30 3. El método de la reivindicación 2, que comprende además el análisis de al menos uno de miR29a o miR335 en comparación con la expresión del sujeto normal, en el que la sobreexpresión de miR29a, o miR335 es indicativa además de neoplasia colorrectal.
- 35 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la una o más muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en uno o más fluidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero o una muestra de sangre.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la una o más muestras biológicas es una muestra de plasma.
- 40 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de expresión del uno o más microARN se mide mediante la obtención del perfil de expresión de microalineamiento, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR de transcriptasa inversa en tiempo real, PCR cuantitativa en tiempo real, PCR de punto final, PCR múltiple de punto final, PCR fría, PCR helada, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación múltiple *in situ* o secuenciación de ácidos nucleicos.
- 45 7. Uso de un kit que comprende reactivos de detección de biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de miR18a y en el que la sobreexpresión de dicho microARN es indicativa de adenomas colorrectales avanzados para diagnosticar *in vitro* el riesgo de adenomas colorrectales avanzados.
- 50 8. Uso de un kit que comprende reactivos de detección de biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de miR18a y miR19a y miR19b o miR18a y miR19a, miR19b y miR15b, en el que la sobreexpresión de dicho miR18a es indicativa de adenomas colorrectales avanzados y en el que la sobreexpresión de una combinación de miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b y miR15b es indicativa de neoplasia colorrectal para diagnosticar *in vitro* el riesgo de adenomas colorrectales avanzados y/o neoplasia colorrectal.
- 55 9. Uso, según la reivindicación 8, en el que el kit comprende además reactivos para la detección y el análisis de al menos uno de miR29a o miR335.
- 60

FIG. 1A

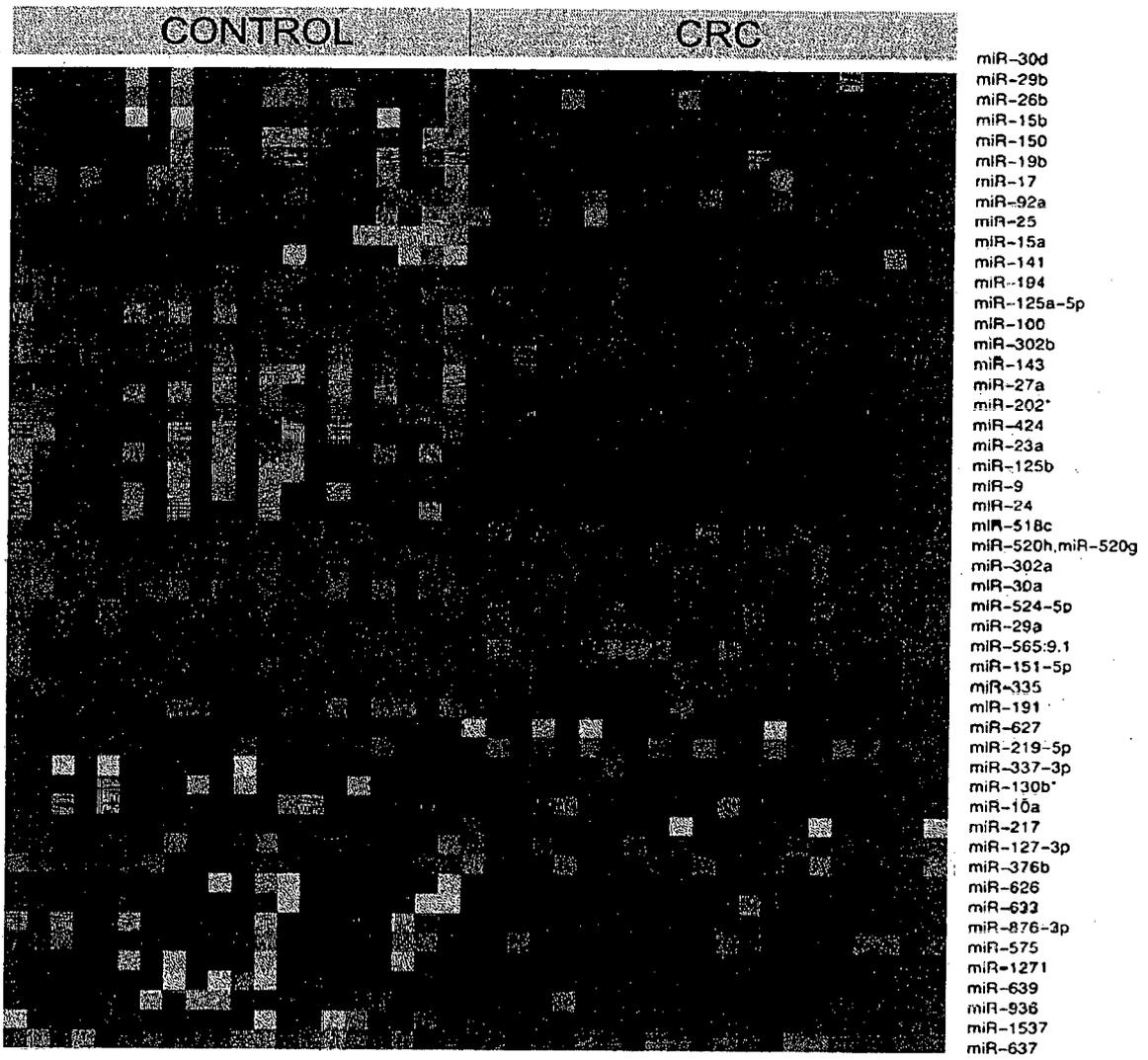
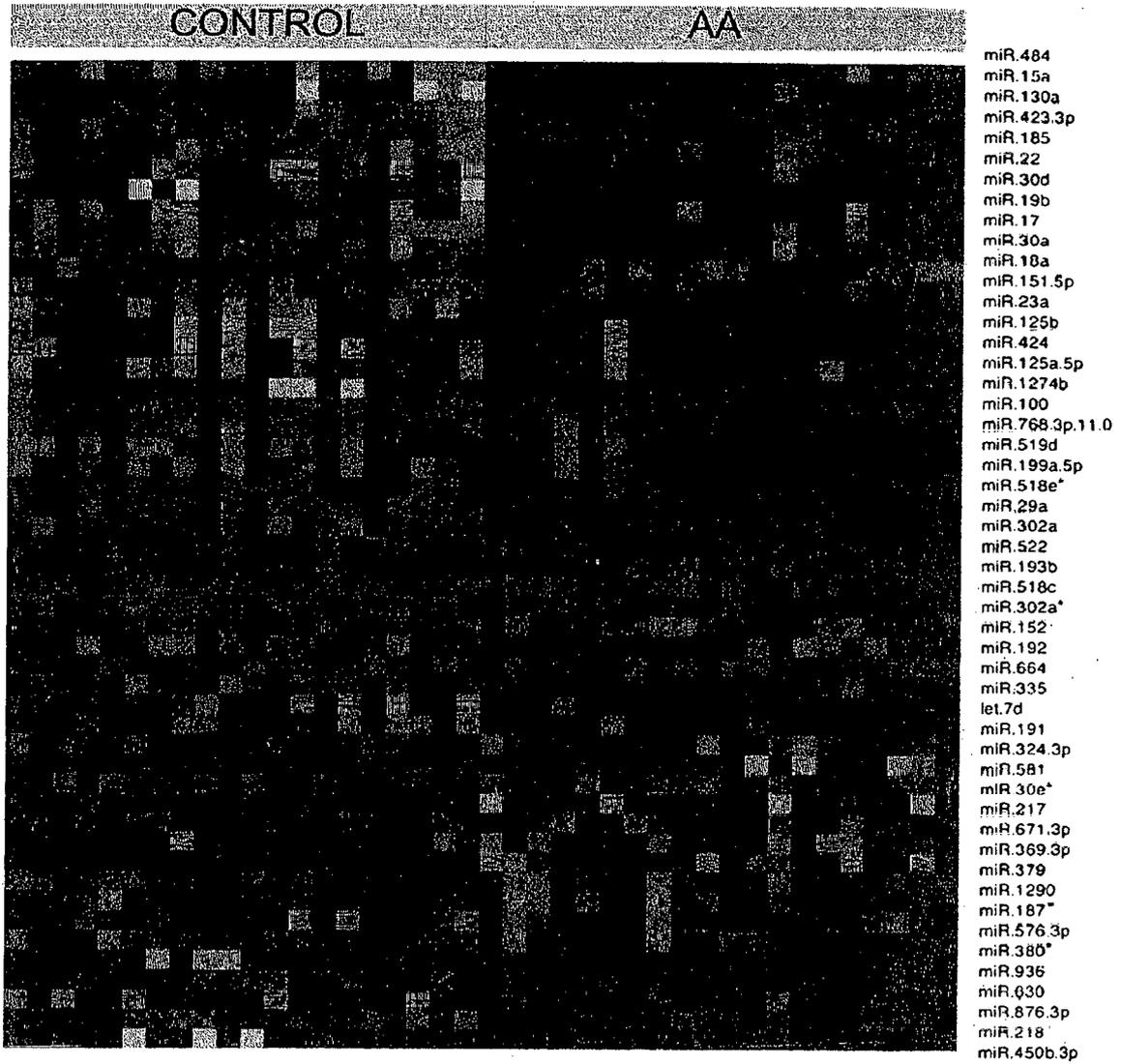


FIG. 1B



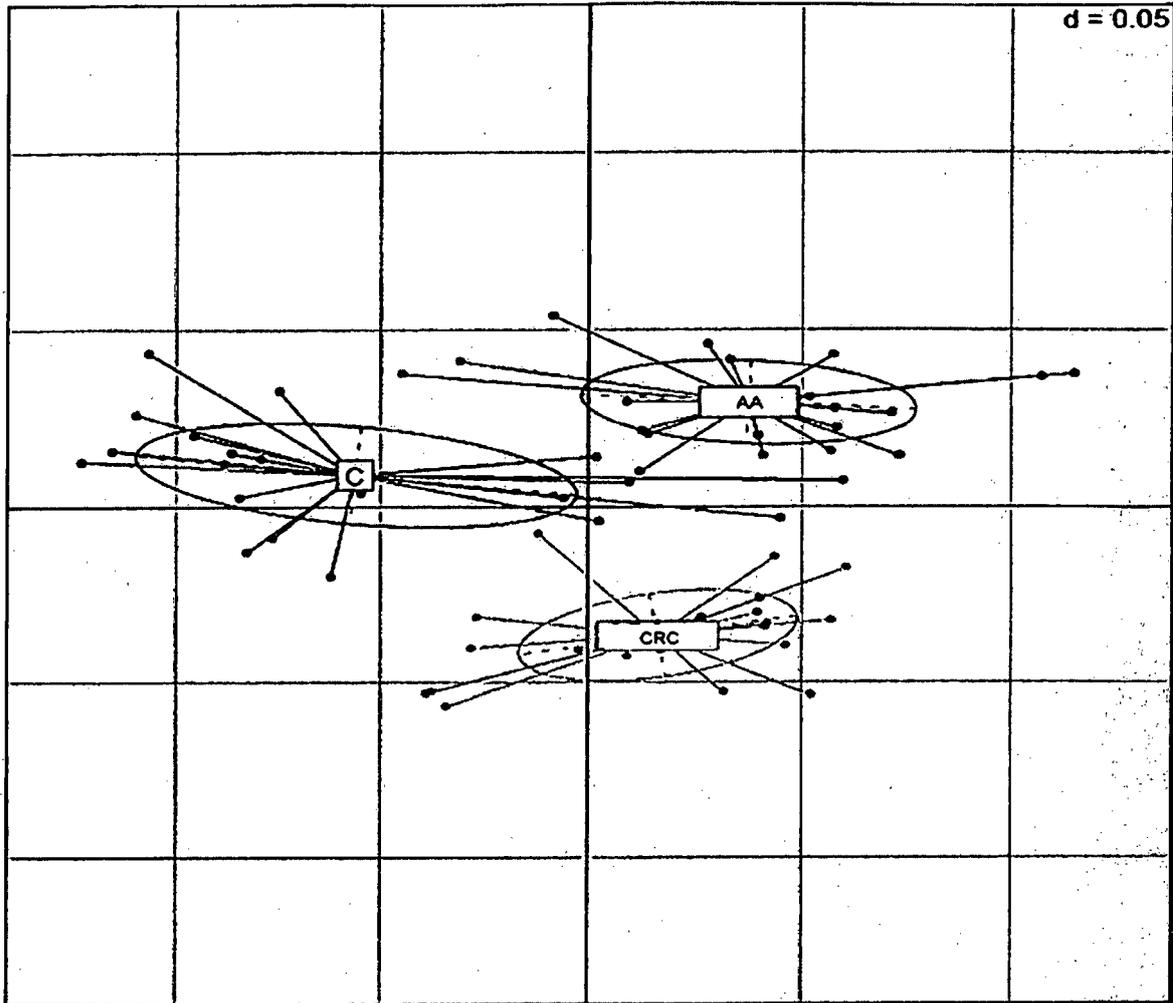


FIG. 2

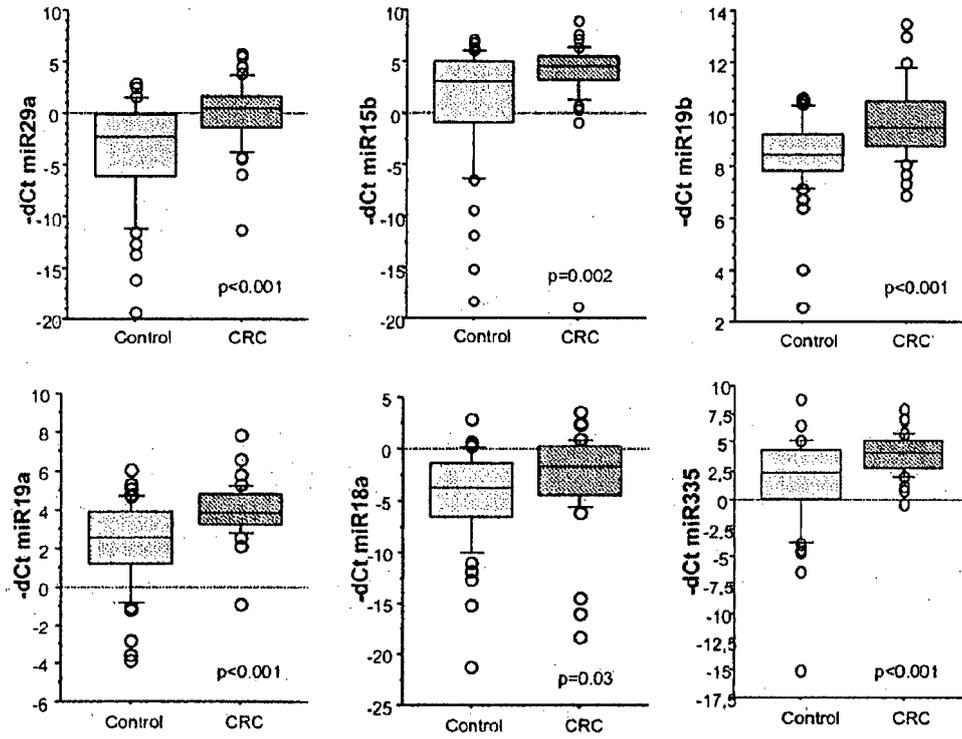


FIG. 3

