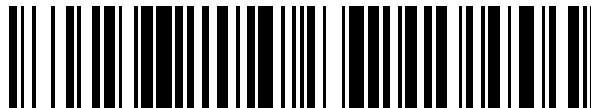


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 693**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2012 PCT/IB2012/003035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093635**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2012 E 12852462 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2768986**

54 Título: **MicroARN plasmáticos 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:

06.11.2018

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 2 688 693 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 plasmáticos para la detección de cáncer colorrectal incipiente

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud provisional de EE. UU. con n.º de serie 61/550.148, presentada el 21 de octubre de 2011, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento por referencia.

10

Campo técnico de la invención

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

15

Declaración de investigación financiada federalmente

Ninguna.

20

Incorporación por referencia de materiales archivados en disco compacto

Ninguna.

25

Antecedentes de la invención

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

30

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

35

40

La solicitud de patente de EE. UU. 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 de identificación de agentes anti-HCC. La solicitud de Croce proporciona un método de diagnóstico de si un sujeto tiene, o corre el 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 corre el riesgo de desarrollar HCC.

45

50

La patente de los EE. UU. n.º 7.939.255, concedida a Chung, se dirige a métodos de diagnóstico para cáncer colorrectal. En resumen, la patente divulga un método de diagnóstico y un kit para la evaluación del pronóstico de cáncer colorrectal (CCR) con un gen supresor de tumores que va a usarse para el diagnóstico de cáncer colorrectal (CCR), en el que el método comprende: identificar regiones recurrentemente alteradas (RAR) en un cromosoma; y detectar alteraciones genómicas en las RAR. Se dice que la invención hace posible realizar un diagnóstico precoz así como una evaluación del pronóstico para diversos cánceres y tumores incluyendo cáncer colorrectal (CCR).

55

En la publicación n.º WO2011076147, titulada Plasma-Based Micro-RNA Biomarkers And Methods For Early Detection of Colorectal, presentada por Li, se divulga un kit de diagnóstico de marcadores moleculares en sangre para el diagnóstico de cáncer colorrectal, y/o la supervisión del 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 un biomarcador de microARN, en el que una o más de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico se expresan de manera diferencial en el plasma del paciente y el control sano, y la una o más moléculas de ácido nucleico expresadas de manera diferencial juntas representan un biomarcador de expresión de ácido nucleico 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 tal estado. Finalmente, la invención proporciona una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal.

65

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 el diagnóstico de cáncer colorrectal, la supervisión de la tratamiento del cáncer y/o el tratamiento de cáncer colorrectal que incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, codificando cada molécula de ácido nucleico 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 juntas representan una firma de expresión de ácido nucleico que es indicativa de la presencia de cáncer colorrectal. Se dice que la invención se refiere además a métodos correspondientes de uso de tales firmas de expresión de ácido nucleico para identificar cáncer colorrectal así como para prevenir o tratar tal estado. Finalmente, la invención se dirige a una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal.

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 progreso de la enfermedad. La enfermedad puede ser un trastorno gastrointestinal, tal como cáncer colorrectal. Los microARN, vesículas o biomarcadores pueden detectarse en un líquido corporal.

La publicación n.º WO2010004562, titulada Methods And Compositions For Detecting Colorectal Cancer, presentada por Baruch, se dice que enseña un método para realizar una detección precoz 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 las mismas o derivadas de las mismas.

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 de Mir-Grupo I que consiste en: miR-21, miR-34a y miR-141, y detectar el nivel de al menos un miR seleccionado de Mir-Grupo II 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 de la invención

En una realización, la presente invención incluye un método para diagnosticar o detectar una neoplasia colorrectal en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas del sujeto que se sospecha que padece una neoplasia colorrectal; medir un nivel o patrón 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 una 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 una neoplasia colorrectal, en el que la sobreexpresión de miR15b, o miR15b en combinación con miR19a y miR19b, o miR19a y miR19b es indicativa de cáncer colorrectal. En un aspecto, el método comprende además el análisis de si al menos uno de miR18a, miR29a o miR335 en comparación con la expresión del sujeto normal es indicativo de una 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 líquidos 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 puede detectar CCR incipiente (I-II) de manera tan precisa como CCR avanzado (estadio II-III), tumores del lado derecho y lesiones del lado izquierdo. En otro aspecto, el método comprende un intervalo de confianza que es del 90, 91, 92, 93, 94 o 95% o mayor. En otro aspecto, el método comprende además determinar el nivel de expresión de microARN que están subexpresados en una 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 la determinación del nivel de expresión de microARN que están sobreexpresados en una neoplasia colorrectal seleccionados de:

5

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 ^a ;
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 obtención del perfil de expresión con micromatrices, PCR, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real cuantitativa, PCR de punto final, PCR de punto final múltiple, COLD-PCR, ICE-COLD-PCR, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación *in situ* múltiple o secuenciación de ácido nucleico. En otro aspecto, el método se usa para tratar a un paciente en riesgo o que padece una neoplasia colorrectal, seleccionar un tratamiento con agentes antineoplásicos para un paciente en riesgo o que padece una neoplasia colorrectal, estratificar un paciente en un subgrupo de neoplasia colorrectal o para un ensayo clínico de tratamiento de una neoplasia colorrectal, determinar la resistencia o grado de respuesta a un régimen terapéutico para una neoplasia colorrectal, desarrollar un kit para el diagnóstico de una neoplasia colorrectal o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, el nivel o patrón de expresión global de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 microARN seleccionados de las tablas 2, 3, 4 y 5, en el que los microARN aumentan la especificidad de la determinación, el diagnóstico o la detección de una neoplasia colorrectal. En otro aspecto, el método comprende además la etapa de usar el nivel o patrón de expresión global de microARN para el pronóstico, la orientación del tratamiento o la supervisión de la respuesta al tratamiento de la neoplasia colorrectal.

20 Aún otra realización de la presente invención 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 del 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 siguientes microARN miR29a, miR92a, miR141, miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a o miR335. En otro aspecto, el biomarcador comprende además microARN que están subexpresados en una 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.

En otro aspecto, el biomarcador comprende además microARN que están sobreexpresados en una neoplasia colorrectal seleccionados de:

5

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 ^a ;
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.

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

5

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 biomarcador comprende además microARN que están sobreexpresados en una 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 ^a ;
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 El experto en la técnica reconocerá que lo más a menudo una biofirma (ensayo) incluirá la combinación de microARN tanto subexpresados como sobreexpresados. Como tal, la presente invención también incluye en un aspecto la combinación de microARN tanto sobreexpresados como subexpresados a partir de los microARN respectivos. En otro aspecto, las muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en uno o más líquidos 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 puede detectar CCR incipiente (I-II) de manera tan precisa como CCR avanzado (estadio II-III), tumores del lado derecho y lesiones del lado izquierdo. En otro aspecto, el nivel o patrón de expresión global de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 microARN seleccionados de las tablas 2, 3, 4 y 5, en el que los microARN aumentan la especificidad de la determinación, el diagnóstico o la detección de una neoplasia colorrectal.

15 Aún otra realización incluye un kit para un diagnóstico de una neoplasia colorrectal que comprende: reactivos de detección de biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de los 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 una 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 su uso en el diagnóstico del riesgo de una neoplasia colorrectal, en el que las instrucciones comprenden directrices etapa a 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 una 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 una 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 líquidos 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 subexpresados en una 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 kit comprende además reactivos para el análisis de microARN que están sobreexpresados en una 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 ^a ;
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 una neoplasia colorrectal seleccionados de los microARN de las tablas 2, 3, 4 y 5.

10 Aún otra realización incluye un método para seleccionar una tratamiento del cáncer para un paciente al que se le diagnostica una 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 una neoplasia colorrectal, en el que la sobreexpresión de los microARN es indicativa de cáncer colorrectal; y seleccionar la tratamiento del cáncer basándose en la determinación de la neoplasia colorrectal en el paciente.

15 Otra realización incluye un método de realización de un ensayo clínico para evaluar un fármaco candidato que se cree que es útil en el tratamiento de una enfermedad, 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 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 comparador 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 comparador 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 significativo en comparación con cualquier cambio que se produzca en el segundo subconjunto de pacientes, en el que una reducción estadísticamente significativa indica que el fármaco candidato es útil en el tratamiento de dicha enfermedad.

30 Aún otra realización de la presente invención incluye un método para diagnosticar o detectar una neoplasia colorrectal en un sujeto humano que comprende las etapas de: identificar el sujeto humano que padece o se sospecha que padece una neoplasia colorrectal; obtener una o más muestras biológicas del sujeto, en el que las muestras biológicas se seleccionan de uno o más líquidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de

suero, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra fecal; medir un nivel o patrón de expresión global de miR15b solo o en combinación con miR18a, miR19a, miR19b, 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 una 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 una neoplasia colorrectal, en el que la sobreexpresión de los microARN: miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a y miR335 es indicativa de cáncer colorrectal.

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

Primeros 60 miARN (LIMMA)	ABC	IC bajo	IC alto	valor de corte	S	ESP
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	0,5514	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 los que ROC son los parámetros de área bajo la curva (ABC), IC es un intervalo de confianza del 95%, S es la sensibilidad y Esp 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 una 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 una 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 una neoplasia colorrectal. En un aspecto, los microARN están subexpresados en una 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 una 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 ^a ;
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 obtención del perfil de expresión con micromatrices, PCR, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real cuantitativa, PCR de punto final, PCR de punto final múltiple, COLD-PCR, ICE-COLD-PCR, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación *in situ* múltiple o secuenciación de ácido nucleico. En otro aspecto, el método se usa para tratar a un paciente en riesgo o que padece una neoplasia colorrectal, seleccionar un tratamiento con agentes antineoplásicos (por ejemplo, agentes de reticulación del ácido nucleico, fármacos tradicionales, productos biológicos, tales como anticuerpos monoclonales con o sin cargas útiles de destrucción celular tanto dirigidos como no dirigidos) para un paciente en riesgo o que padece una neoplasia colorrectal, estratificar un paciente en un subgrupo de neoplasia colorrectal o para un ensayo clínico de tratamiento de una neoplasia colorrectal, determinar la resistencia o grado de respuesta a un régimen terapéutico para una neoplasia colorrectal, desarrollar un kit para el diagnóstico de una neoplasia colorrectal o cualesquiera combinaciones de los mismos. En otro aspecto, el nivel o patrón 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 una neoplasia colorrectal.

Breve descripción de los dibujos

20 Para una comprensión más completa de las características y ventajas de la presente invención, se hace referencia ahora 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 micromatrices entre pacientes con CCR 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 FM más alto. Los píxeles rojos corresponden a un aumento de la abundancia de miARN en la muestra de plasma indicada, mientras que los píxeles verdes indican una disminución de los niveles de miARN.

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

La figura 3 muestra gráficos de cajas que muestran la expresión de miARN plasmáticos en el conjunto 2 de CCR 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.

Las figuras 4A y 4B son análisis de eficacia diagnóstica (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 con micromatrices en el conjunto 1 de CCR y los datos de qRT-PCR del conjunto 2 de CCR.

Descripción detallada de la invención

Mientras que la preparación y el uso de diversas realizaciones de la presente invención se analizan en detalle a continuación, debe apreciarse que la presente invención proporciona muchos conceptos de la invención aplicables que pueden realizarse en una amplia variedad de contextos específicos. Las realizaciones específicas analizadas en el presente documento son meramente ilustrativas de modos específicos para preparar y usar la invención y no delimitan el alcance de la invención.

Para facilitar la comprensión de esta invención, se definen varios términos a continuación. Los términos definidos en el presente documento tienen significados comúnmente entendidos por una persona de experiencia 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 que 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 explica resumidamente en las reivindicaciones.

Abreviaturas: adenomas avanzados, AA; área bajo la curva de ROC, ABC; análisis entre grupos, AEG; cáncer colorrectal, CCR; factor de multiplicación, FM; modelos lineales para datos de micromatrices, LIMMA; microARN, miARN; curva de eficacia diagnóstica, curva de ROC.

Tal como se usan el presente documento, el término “cáncer colorrectal” y “neoplasia colorrectal” incluyen la definición médica bien aceptada que define 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 estadio incipiente y en estadio tardío. 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 íleon).

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 que incluye cualquier material compuesto por una o más células, o bien individualmente 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 celular, producto o subproducto 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 definidas 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.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gen” se refiere a una proteína, polipéptido o unidad que codifica 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 pueden haberse alterado por la mano del hombre. Se usan genes, ácidos nucleicos, 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 el que están asociados habitualmente. El término “alelo” o “forma alélica” se refiere a una versión alternativa de un gen que codifica la misma proteína funcional pero que contiene diferencias en la secuencia de nucleótidos en relación con otra versión del mismo gen.

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 tallo-bucles pequeños a partir de los cuales se escinden “miARN” maduros, por ejemplo, mediante Dicer. Los “miARN” están codificados en genes distintos de los ARNm cuya expresión controlan.

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 por cualquiera de ligación, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasas. Las moléculas de ácido nucleico pueden

5 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 α -enantioméricas de nucleótidos que se producen de manera natural), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos glucídicos y/o en restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones glucídicas incluyen, por ejemplo, reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o pueden funcionalizarse azúcares como éteres o ésteres. Además, el resto glucídico 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. Los monómeros de ácido nucleico pueden unirse mediante enlaces fosfodiéster o análogos de tales uniones. Los análogos de uniones fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato, y similares. El término "molécula de ácido nucleico" también incluye los denominados "ácidos peptidonucleicos", 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 producto bioquímico específico en el cuerpo 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 respectiva condición de diagnóstico 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: CH_2Cl_2 , % elevado de COHb; diagnóstico: contaminación del aire en interiores), cloroformo (fuente: compuestos halogenados), diclorobenceno (fuente: compuestos halogenados), dietilamina (fuente: colina; diagnóstico: crecimiento excesivo de bacterias intestinales), H (hidrógeno) (fuente: intestinos; diagnóstico: intolerancia a la lactosa), isopreno (fuente: ácido graso; diagnóstico: estrés metabólico), metanotiol (fuente: metionina; diagnóstico: crecimiento excesivo de bacterias intestinales), metiletilcetona (fuente: ácido graso; diagnóstico: contaminación del aire en interiores/dieta), O-toluidina (fuente: metabolito de carcinoma; diagnóstico: carcinoma broncogénico), sulfuros de pentano y sulfuros (fuente: peroxidación lipídica; diagnóstico: infarto de miocardio), H_2S (fuente: metabolismo; diagnóstico: enfermedad periodontal/ovulación), MeS (fuente: metabolismo; diagnóstico: cirrosis) y Me_2S (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 la χ^2 , prueba de la t) la probabilidad de que los grupos sean iguales es menor del 5%, por ejemplo $p < 0,05$. En otras palabras, la probabilidad de obtener los mismos resultados en una base completamente aleatoria es menor de 5 de 100 intentos.

El término "kit" o "kit de prueba" indica combinaciones de reactivos y adyuvantes requeridos para un análisis. Aunque un kit de prueba consiste en la mayoría de los casos en varias subunidades, también están disponibles elementos de análisis de una pieza, que deben considerarse asimismo como kits de prueba.

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 de EE. UU. n.^{os} 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188, incorporadas en el presente documento por 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 proceso 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 térmico en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios a sus respectivas hebras de la secuencia diana bicatenaria. Para efectuar la amplificación, la mezcla se desnaturaliza y los cebadores se hibridan entonces con sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Tras la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa para formar un nuevo par de hebras complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridación del cebador y extensión de la polimerasa pueden repetirse muchas veces (es decir, la desnaturalización, la hibridación 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 entre sí, y por tanto, esta longitud es un parámetro controlable. En virtud del aspecto de repetición del proceso, 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 pueden medirse mediante obtención del perfil de expresión con micromatrices, PCR, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real cuantitativa, PCR de punto final, PCR de punto final múltiple, ICE-COLD-PCR, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación *in situ* múltiple o secuenciación de ácido nucleico. Sin embargo, pueden usarse otras técnicas para determinar la expresión de microARN tales como resonancia de plasmón superficial, efectos de resonancia de fluorescencia (transferencia, extinción y variantes de la misma) 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, a medida que se miden más microARN (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 subexpresados. Como tal, la presente invención también incluye en un aspecto la combinación de microARN tanto sobreexpresados como subexpresados a partir de los microARN respectivos.

La presente invención puede usarse para el diagnóstico y tratamiento de pacientes, lo que incluye o puede extenderse a pronóstico, orientación del tratamiento, supervisión 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 codificantes pequeñas, endógenas y conservadas de manera evolutiva 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 del 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 circulantes es muy prometedora como estrategia no invasiva nueva para el diagnóstico de cáncer y otras enfermedades.

El cáncer colorrectal (CCR) es el segundo cáncer más común en los países industrializados, y representa la segunda causa principal de muerte relacionada con cáncer[8]. Afortunadamente, hay pruebas de que el cribado de individuos en riesgo promedio puede dar como resultado una reducción de la mortalidad e incidencia por la detección precoz del cáncer y la eliminación de lesiones precursoras de cáncer[9]. De hecho, el objetivo de los programas de cribado es la detección de CCR en estadio incipiente y adenomas avanzados (AA) que son lesiones premalignas asociadas con un alto riesgo de progresión a una lesión invasiva.

Actualmente, no existe una estrategia óptima y universalmente aceptada para el cribado del CCR [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 CCR, lo que sugiere un papel potencial 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 prestación en la detección de individuos que albergan CCR y/o lesiones precursoras de cáncer. En el presente estudio, se realizó obtención del perfil de miARN plasmáticos mediante micromatrices en un conjunto de pacientes con CCR o AA, e individuos sanos, identificando un grupo de miARN que podían detectar pacientes con una 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 CCR. Desafortunadamente, la capacidad de discriminación de estos miARN estaba limitada a la detección de lesiones precursoras de cáncer.

Los miARN circulantes son muy prometedores como biomarcadores nuevos para el diagnóstico de cáncer y otras enfermedades. Se necesitan urgentemente enfoques no invasivos que puedan complementar y mejorar las estrategias actuales para el cribado del cáncer colorrectal (CCR). Se realizó obtención del perfil de miARN plasmáticos del genoma completo mediante micromatrices en un conjunto de individuos (n=61) incluyendo pacientes con CCR 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 CCR o AA mostraron perfiles de expresión de miARN plasmáticos significativamente diferentes en comparación con los controles. Se seleccionó un grupo de 13 miARN para validarse en una cohorte independiente de pacientes, y se confirmó que 6 de ellos estaban significativamente sobreexpresados en el grupo de CCR, mostrando una alta precisión 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 Clínic de Barcelona,

Cataluña, España, y Hospital de Donostia, Guipúzcoa, España) en este estudio. De ellos, se excluyeron 77 porque 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, que presentaban enfermedad inflamatoria intestinal, que se sometían 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 presencia de hemólisis en muestras de plasma. Finalmente, se incluyeron 196 individuos: 123 pacientes recién diagnosticados de una neoplasia colorrectal esporádica (63 con CCR y 40 con AA) y 73 individuos sanos sin antecedentes personales de algún cáncer y con una colonoscopia reciente que confirmaba 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 $\geq 20\%$ de componente vellosa. Se dividieron estos individuos en dos conjuntos diferentes y no relacionados: conjunto 1, 61 sujetos del Hospital Clínic de Barcelona, que se emplearon para realizar obtención del perfil de expresión de microARN plasmáticos del genoma completo; y conjunto 2. 135 sujetos del Hospital de Donostia, que se incluyeron para validar adicionalmente los resultados obtenidos en el conjunto 1. Las características de los participantes se muestran en la tabla 1. Se extrajeron muestras de sangre antes de la endoscopia o cirugía en todos los individuos.

Tabla 1. Características de los pacientes.

	Conjunto 1 (micromatriz)		Conjunto 2 (qRT-PCR)	
	Control (n=20)	Neoplasia (n=41)	Control (n=53)	Neoplasia (n=82)
Edad media (DE)	60,6 (12,5)	72,5 (9,7)	62,1 (3,5)	62,8 (6,3)
Sexo - n.º				
Masculino	11	20	26	42
Femenino	9	21	27	40
Características de cáncer colorrectal				
Pacientes - n.º	-	21	-	42
Estadio según 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

El estudio fue aprobado por el Comité ético institucional del Hospital Clínic de Barcelona (fecha de aprobación: 26/03/2009), y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes según la Declaración de Helsinki.

Extracción de ARN a partir de muestras de plasma. Se extrajeron veinte ml de sangre completa de cada participante en tubos con 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 sangre. En resumen, se centrifugaron las muestras a 1.600 x g durante 10 min a 4°C para sedimentar 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 μ l de plasma usando reactivo Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 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 tubo nuevo y se añadió adicionalmente un volumen de Trizol LS. Tras la segunda separación de fases, se añadió un volumen de 1,5 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 el tratamiento con ADNasa (Qiagen) para eliminar cualquier ADN contaminante. El volumen de elución final fue de 30 μ l. Se cuantificó la concentración de ARN usando un instrumento NanoDrop 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE) en todas las muestras y osciló desde 3 a 35 ng/ μ l. Se repitió el proceso de extracción para cada muestra hasta obtener suficiente cantidad de ARN para las siguientes etapas.

Obtención del perfil de miARN plasmáticos del genoma completo. Se realizó la obtención del perfil de expresión de miARN en todas las muestras a partir 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). Esta micromatriz contiene 1.146 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. El ensayo de micromatrices de miARN se realizó 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 datos usando el software de análisis de datos BeadStudio y se transformaron a la escala de base logarítmica 2. Se normalizaron por cuantiles los datos de micromatrices de todas las muestras usando el paquete Lumi bioconductor [15].

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 proceso de preamplificación múltiple previo. En resumen, se sometieron a transcripción inversa 21 ng de ARN plasmático con una mezcla de cebadores para RT Megaplex (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) y se preamplificaron con cebadores Megaplex PreAmp y mezcla maestra para TaqMan PreAmp (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 Viia7 (Applied Biosystems Inc.). Se analizaron varios supuestos ARN nucleares pequeños constitutivos con el fin de determinar la más adecuada de las muestras (RNU6B, miR16, miR423-5p, RNU48, miR544, miR103, miR525, miR451). MiR16 presentaba 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 ΔCt [$\Delta Ct = Ct$ de miARN diana - Ct de miARN de control interno].

Análisis estadístico. Se usó un modelo lineal para datos de micromatrices (LIMMA) para identificar miARN expresados de manera diferencial entre grupos. LIMMA usa modelos lineales y estadístico t o estadístico F moderado apareado de Bayes empírico [18]. Se usaron los miARN más significativos usando estadístico F para realizar análisis de correspondencia tal como se implementa en la función de análisis entre grupos (AEG) incluida en el paquete made4 [19]. Este método es puede visualizar datos de grandes dimensiones (tales como múltiples mediciones de expresión) en un gráfico bidimensional en el que las áreas delimitadas por las elipses representan el 95% de la distribución binormal estimada de las puntuaciones de muestras en los ejes primero y segundo [20]. Se realizaron diagramas de Venn considerando como aciertos solo miARN con un factor de multiplicación absoluto mayor de 1,5 y un valor de p moderado $<0,05$ (recuentos de Venn y diagrama de Venn del paquete LIMMA). Se analizaron variables cuantitativas usando la prueba de Student. Un valor de p bilateral $<0,05$ se consideró significativo. La evaluación de la capacidad de predicción de miARN individuales y diferentes combinaciones de miARN, ajustadas por edad y sexo, se calcularon usando regresión logística (distribución de GLM binomial). Se calcularon gráficos de análisis de ROC y puntos de corte derivados, así como parámetros de precisión de discriminación global, usando el paquete R DiagnosisMed. La sensibilidad y especificidad se calcularon 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 del genoma completo 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 circulantes entre pacientes con CCR e individuos sanos, se realizaron experimentos con micromatrices de miARN en ARN total obtenidos de muestras de plasma de 21 pacientes con CCR y 20 controles sanos. Para investigar adicionalmente si se encontraban patrones de expresión de miARN alterados en pacientes con lesiones precursoras de cáncer colorrectal, también se realizaron experimentos con micromatrices de miARN en ARN plasmático de 20 pacientes con adenomas colorrectales avanzados (AA).

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

Tabla 2. Parámetros del factor de multiplicación y del valor de p para los primeros 50 miARN desregulados en CCR

que muestran los factores de multiplicación más altos.

Primeros 50 miARN	N.º de MIMAT	FM	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. Capacidad de predicción de cada miARN individual entre los primeros 50 miARN desregulados en CCR. Se muestran parámetros de curva de ROC (área bajo la curva (ABC) e intervalo de confianza (IC) del 95%, y sensibilidad (S) y especificidad (Esp) correspondientes a un punto de corte óptimo.

5

Primeros 50 miARN	ABC	IC bajo	IC alto	Punto de corte	S	Esp
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

ES 2 688 693 T3

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
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 del factor de multiplicación y del valor de p para los primeros 50 miARN desregulados en AA que muestran los factores de multiplicación más altos.

Primeros 50 miARN	N.º de MIMAT	FM	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	MI0006427	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. Capacidad de predicción de cada miARN individual entre los primeros 50 miARN desregulados en AA. Se muestran parámetros de curva de ROC (área bajo la curva (ABC) e intervalo de confianza (IC) del 95%, y sensibilidad (S) y especificidad (Esp) correspondientes a un punto de corte óptimo.

5

Primeros 50 miARN	ABC	IC bajo	IC alto	Punto de corte	S	Esp
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.518e*	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	80	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 expresión de miARN plasmáticos basándose en micromatrices son técnicamente reproducibles. Inicialmente, se realizó una qRT-PCR en tiempo real para confirmar los resultados de micromatrices en 28 muestras seleccionadas aleatoriamente del conjunto 1 (19 pacientes con neoplasias colorrectales y 9 controles sanos). Para estos estudios, se seleccionaron un total de 14 miARN candidatos. Se eligieron doce miARN candidatos (miR17-5p, miR92a, miR19b, miR18a, miR29a, miR302a, miR23a, miR27a, miR24, miR335, miR424 y miR15b) para que estuvieran presentes en los primeros 50 miARN desregulados en CCR y/o AA y para que tuviesen una intensidad de micromatrices en base logarítmica $2 \geq 8$. También se seleccionaron dos miARN adicionales (miR19a y miR20a) para que fuesen parte del grupo génico miR17-92, uno de los grupos génicos de miARN oncogénicos mejor caracterizadas, aunque no satisfacían los criterios previos. Globalmente, los datos de qRT-PCR y micromatrices estaban correlacionados (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 estaban sobreexpresados en pacientes con CCR de una cohorte independiente. En segundo lugar, se analizaron los 13 miARN candidatos que mostraron amplificación adecuada en la fase previa (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 CCR 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 estaban significativamente regulados por incremento en pacientes con CCR (figura 3). Además, miR-24 también se sobreexpresaba en este grupo de pacientes pero sin alcanzar significación estadística ($p=0,08$). De manera notable, los miARN validados en este segundo conjunto también demostraron una alta precisión en la discriminación de CCR de controles sanos con áreas bajo la curva de ROC (ABC) que oscilaban desde 0,8 (IC del 95%: 0,71-0,89) a 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 CCR con respecto a cada uno de ellos solo. Entre las combinaciones que muestran la mejor capacidad de discriminación destacaron 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 CCR incipiente (TNM I-II) y avanzado (TNM III-IV). Tal como se expuso en la tabla 2, ambas firmas mostraron una alta precisión de discriminación en casos tanto incipientes como avanzados. De manera similar, se examinó si estas firmas también podían detectar tumores del lado derecho de manera tan precisa como del lado izquierdo, y era el caso de ambos (tabla 2).

Tabla 6. Capacidad de predicción de las mejores firmas de miARN plasmáticos en pacientes con CCR del conjunto 2.

FIRMAS:	miR19a+miR19b	miR19a+miR19b+miR15b
Todos los CCR (n=42)		
ABC (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)		
ABC (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)		
ABC (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)		
ABC (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)		
ABC (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

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

10 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 sobreexpresado en ambos conjuntos de pacientes con CCR estaba también aumentado en pacientes que albergaban lesiones precursoras de cáncer, que se analizaron mediante qRT-PCR en tiempo real en muestras de plasma a partir de una cohorte independiente de 40 pacientes con AA y 53 controles sanos. Se confirmó que el miR18a estaba significativamente sobreexpresado
15 en este segundo conjunto de pacientes con AA en comparación con los controles, como también 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 (ABC: 0,84, IC del 95%: 0,72-0,96, S: 80%, Esp: 80%), este parámetro era menor en el segundo conjunto de pacientes (ABC: 0,64, IC del 95%: 0,52-0,75, S: 72%, Esp: 57%).

20 En este estudio, los inventores realizaron obtención del perfil de miARN del genoma completo mediante micromatrices en muestras de plasma de pacientes con CCR o AA, e individuos sanos. Estos resultados muestran que la expresión de miARN plasmáticos puede discriminar entre pacientes con una neoplasia colorrectal y sujetos de control, lo que sugiere su valor potencial para la detección no invasiva de estas lesiones. Por lo que conocen los inventores, este es el primer informe que analiza la expresión del genoma completo de miARN plasmáticos en
25 pacientes con CCR y AA mediante una tecnología de alto rendimiento y, luego, validación de los resultados en una cohorte independiente externa. 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 CCR o AA. Además, se ha confirmado la alta capacidad de discriminación entre CCR e individuos sanos de seis microARN plasmáticos en una cohorte diferente y usando una tecnología diferente. Merece la pena mencionar que cinco de
30 estos miARN (es decir, miR19a, miR19b, miR18a, miR15b y miR335) representan biomarcadores novedosos, no notificados previamente.

El reciente descubrimiento de miARN estables en plasma y otros líquidos ha abierto la posibilidad de usar estas moléculas como biomarcadores de enfermedad, y varios estudios han evaluado esta estrategia en diferentes
35 entornos. En cáncer humano, este enfoque es realmente prometedor porque el análisis de miARN circulantes relacionados con tumores podría probablemente detectar una neoplasia de una manera no invasiva. Sin embargo, mientras que la mayoría de los estudios de obtención del perfil de expresión de miARN en cáncer se han realizado usando muestras de tejido, solo un pequeño número de ellos se han centrado en el valor potencial de miARN circulantes en diagnóstico y pronóstico [21-23]. De manera notable, el uso de miARN como biomarcadores parece
40 ser una estrategia mejor que marcadores de ARN o proteína debido a la alta estabilidad de estas moléculas, incluso en presencia de ARNasas [23].

Hasta la fecha, solo unos pocos estudios han analizado la expresión de algunos miARN plasmáticos candidatos en CCR. 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 CCR en comparación con sujetos de control. Sin embargo, su análisis inicial se limitaba a 95 miARN en 10 muestras de plasma (cinco pacientes con CCR y cinco individuos sanos). Más importante, este estudio solo evaluó la utilidad potencial de miARN plasmáticos en el diagnóstico de CCR pero no en la identificación de lesiones precursoras [24]. Poco después, Huang *et al.* notificaron la utilidad potencial de 2 miARN plasmáticos, miR29a y miR92a, para detectar pacientes con tanto CCR como AA. Sin embargo, este análisis de qRT-PCR se restringió 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 CCR 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 los niveles plasmáticos de miR141 en pacientes con CCR metastásico 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 CCR y AA, con el fin de identificar los miARN plasmáticos con utilidad potencial 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 CCR, y 125 en pacientes con AA, mostrando algunos de ellos una buena capacidad de discriminación. Es importante mencionar que entre esos miARN significativamente regulados por incremento en el análisis de micromatrices, los presentes inventores no solo confirmaron que esos miARN plasmáticos estaban relacionados con CCR en estudios previos, tales como miR29a, miR92a y miR141, sino que también notificaron nuevos miARN candidatos con implicación potencial en carcinogénesis de CCR. Además, entre estos miARN sobreexpresados, se encontraron todos los miembros del grupo génico miR17-92 (miR17, miR92a, miR19a, miR19b, miR18a y miR20a) y dos miembros del grupo génico miR106b-25 (miR-25 y miR93), un grupo génico caracterizado menos extensamente parálogo a miR17-92 en mamíferos. Estos hallazgos destacan al grupo génico miR17-92 como un actor central en la carcinogénesis colorrectal. El grupo génico miR17-92, también designado oncomiR1, es uno de los grupos génicos de miARN oncogénicos mejor caracterizados [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 el grupo génico miR17-92 [29].

Los presentes inventores demostraron que algunos de los miARN regulados por incremento en el primer conjunto de pacientes con CCR (es decir, miR18a, miR19a, miR19b, miR15b, miR29a y miR335) también estaban sobreexpresados en una cohorte independiente. De manera notable, estos miARN validados mostraron una alta precisión de discriminación para CCR y varias combinaciones de estos miARN mejoraban la capacidad de discriminación de cualquiera de estos miARN solos. Además, podían detectar CCR incipiente (I-II) de manera tan precisa como CCR avanzado (estadio II-III), así como tumores del lado derecho de manera tan precisa como lesiones del lado izquierdo. Estos resultados indican la utilidad potencial de estos miARN plasmáticos como nuevos biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de CCR.

Con respecto a lesiones precursoras de cáncer colorrectal, se encontró que solo uno de los seis miARN sobreexpresados en CCR (miR-18a) se confirmó que estaba significativamente sobreexpresado en las dos cohortes independientes de pacientes con AA. Aunque miR-18a mostraba una capacidad de discriminación bastante buena en el primer conjunto de pacientes, esta capacidad era moderada en la segunda cohorte. Por consiguiente, los resultados obtenidos en pacientes con AA no son concluyentes y serían necesarios estudios adicionales para establecer si hay algún miARN solo o en combinación que pueda detectar estas lesiones premalignas de manera precisa. De hecho, en la cohorte de pacientes con AA analizada por Huang *et al.* dos miR plasmáticos (miR-29a y miR-92a) mostraron una precisión bastante buena en la discriminación de AA con respecto a los controles [16]. Estos dos miARN plasmáticos estaban también significativamente sobreexpresados 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 podría 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 cribado del CCR no invasivo. De hecho, merece la pena mencionar que pruebas inmunoquímicas fecales, una estrategia actualmente aceptada para el cribado del CCR no invasivo en la población de riesgo promedio, muestra unas buenas prestaciones para el diagnóstico de CCR pero pasa por alto a casi el 50% de AA, tal como se ha demostrado recientemente en un estudio del presente grupo [12].

De manera interesante, todos los miARN validados en este estudio se ha notificado previamente que están sobreexpresados en muestras de tejido de pacientes con CCR [30-34]. Por consiguiente, puede plantearse la hipótesis de que CCR constituya 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 biomarcadores potentes para el diagnóstico de CCR sino que también destacan su implicación en carcinogénesis colorrectal. Además, considerando el potencial 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 de cáncer colorrectal. Por ejemplo, el método puede comprender además la determinación del nivel de expresión de microARN que están subexpresados en una 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

el método puede comprender además la determinación del nivel de expresión de microARN que están sobreexpresados en una 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 ^β ;
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 ^α ;
hsa-miR-132 ^α ; γ
hsa-miR-921.

5 Aún otra biofirma o ensayo incluirá la combinación de microARN tanto subexpresados como sobreexpresados, 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 sobreexpresados como subexpresados 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 CCR y AA muestran perfiles de miARN significativamente diferentes en comparación con los individuos sanos. Estos miARN circulantes relacionados con tumores constituyen biomarcadores novedosos y representan una estrategia potencial para el diagnóstico precoz no invasivo. En este estudio, se identificaron seis miARN plasmáticos candidatos prometedores para la detección de CCR. No obstante, este enfoque debe validarse adicionalmente en cohortes más grandes de pacientes, especialmente aquellos con AA, con el fin de evaluar su eficacia y aplicabilidad potencial en un entorno de cribado.

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

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

25

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia 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 por referencia en el mismo grado que si cada publicación o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente que se incorpora por referencia.

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 consistente 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 queriendo decir “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas solo o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación soporta 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 de error inherente para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y 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 “incluye” e “incluyen”) o “que contiene” (y cualquier forma de contener, tal como “contiene” y “contienen”) son inclusivas o de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas de método adicionales, no mencionados. 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 a los que no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(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 ejemplo, impurezas asociadas habitualmente con el elemento o la 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” pretende incluir 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 sucesivamente. 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 de otra forma evidente a partir del contexto.

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

Todas las composiciones y/o los métodos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva en vista de la presente divulgación. Aunque las composiciones y los 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 definido por las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

1. Esquela-Kerscher, A. y Slack, F.J. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 259-69.
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.
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.
5. Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanian, 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 bloodbased markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 10513-8.
- 5 6. Gilad, S., Meiri, E., Yogeve, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholak, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y. y Chajut, A. (2008) Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*, 3, e3148.
- 10 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.
- 15 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.
10. Hoff, G. y Dornitz, J.A. Contrasting US and European approaches to colorectal cancer screening: which is best? *Gut*, 59, 407-14.
- 20 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.
- 25 12. Quintero, E., Castells, A., Bujanda, L., Cubiella, J., Salas, D., Lanás, 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., Roncales, M.P., Polo-Tomas, M., Bessa, X., Ferrer-Amengou, 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.
- 30 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 miRNA profiling platform. *BMC Med Genomics*, 2, 57.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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., Rehauer, 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.
- 55 21. Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulwood, 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.
- 60 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.
- 65 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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 biomarker 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.
- 20 28. Olive, V., Jiang, I. y He, L. mir-17-92, a cluster of miRNAs 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar o detectar una neoplasia colorrectal en un sujeto humano que comprende las etapas de:
- 5 a. obtener una muestra biológica seleccionada de la lista que consiste en una muestra de plasma, una muestra de suero y una muestra de sangre del sujeto que se sospecha que padece una neoplasia colorrectal;
- 10 b. medir un nivel o patrón de expresión global de una biofirma de microARN que comprende al menos el microARN miR15b obtenido de la(s) muestra(s) biológica(s) del sujeto; y
- 15 c. comparar el patrón de expresión global de la biofirma de microARN de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece una neoplasia colorrectal con el patrón de expresión global de la biofirma de microARN de una muestra biológica de un sujeto normal,
- en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece una neoplasia colorrectal, y en el que la sobreexpresión de al menos miR15b es indicativa de cáncer colorrectal.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además el análisis de al menos uno de miR29a, miR19a, miR19b o miR335 en comparación con la expresión a partir del sujeto normal, en el que la sobreexpresión del miARN miR15b en combinación con al menos uno de miR29a, miR19a, miR19b o miR335 es indicativa de una neoplasia colorrectal.
- 25 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el método puede detectar CCR incipiente (I-II) de manera tan precisa como CCR avanzado (estadio II-III), tumores del lado derecho y lesiones del lado izquierdo.
4. Un método para estratificar un paciente en un subgrupo en riesgo de padecer una neoplasia colorrectal usando el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 5. Un método para determinar la resistencia o grado de respuesta a un régimen terapéutico para una neoplasia colorrectal usando el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 35 6. Uso *in vitro* de un kit para un diagnóstico de una neoplasia colorrectal que comprende reactivos de detección de biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos miR15b en una muestra de plasma, una muestra de suero o una muestra de sangre.
- 40 7. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación 6, que comprende además herramientas, recipientes y reactivos necesarios para obtener muestras de un sujeto seleccionadas del grupo que consiste en una muestra de plasma, una muestra de suero o una muestra de sangre.

FIG. 1A

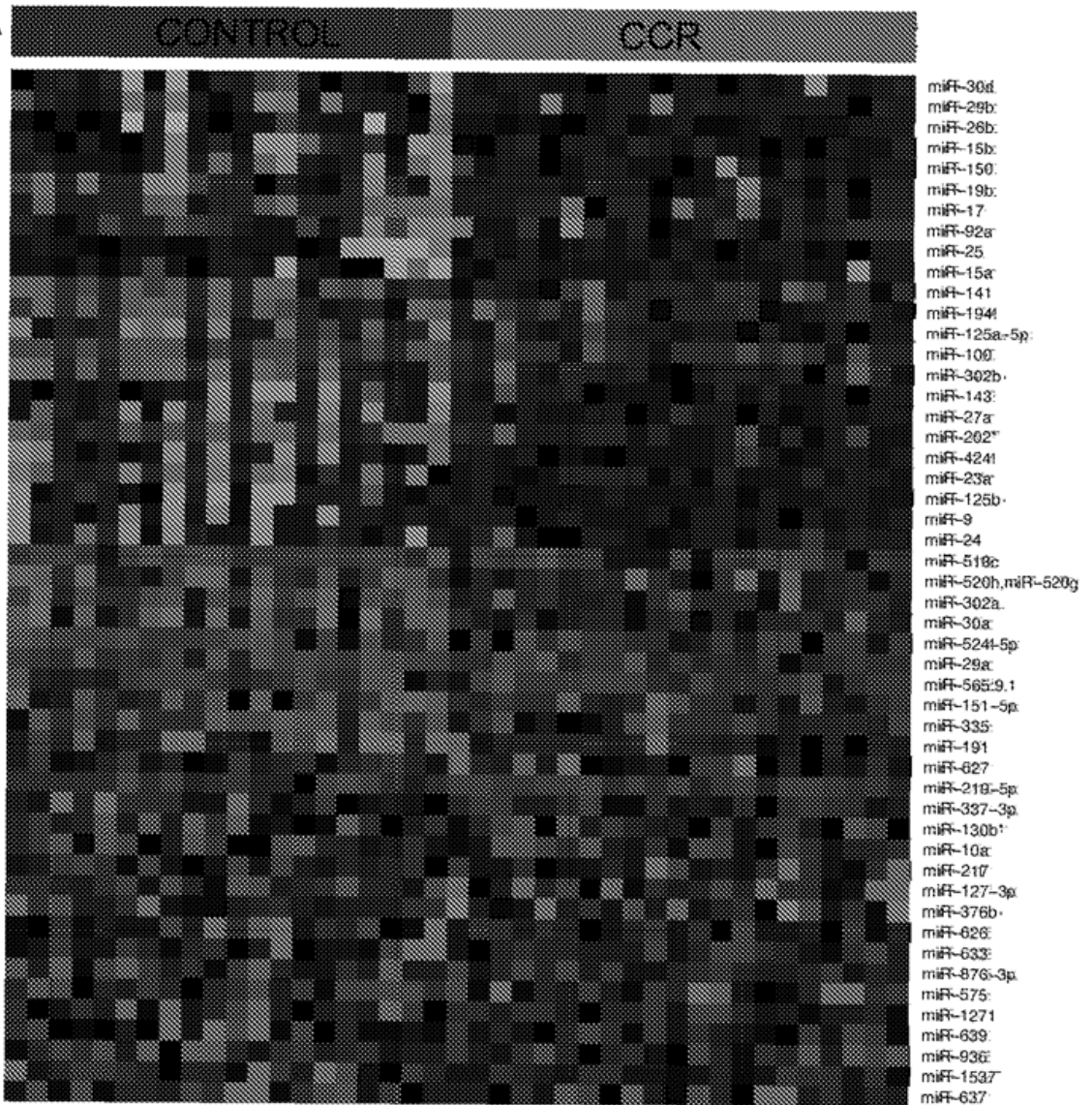
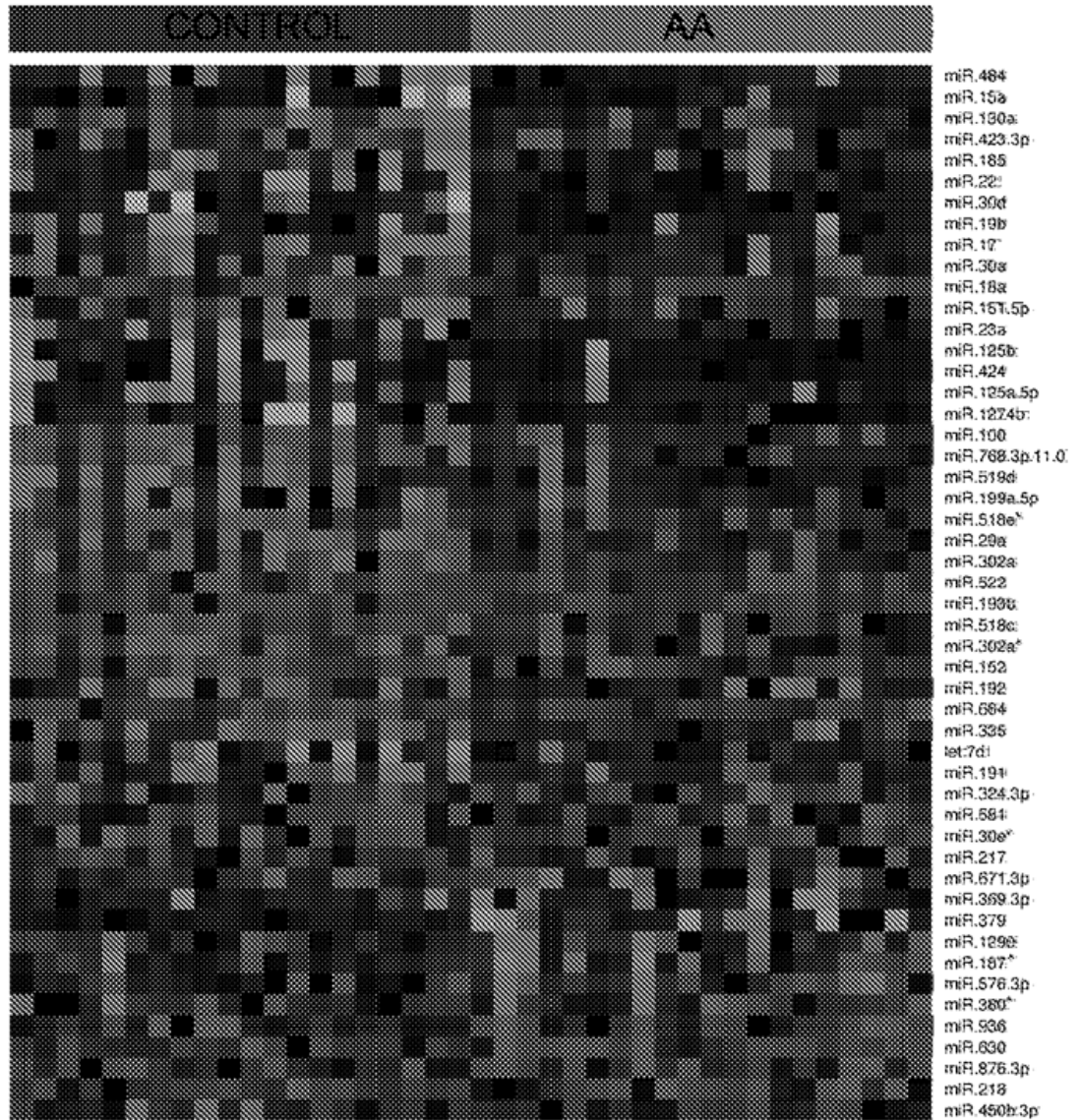


FIG. 1B



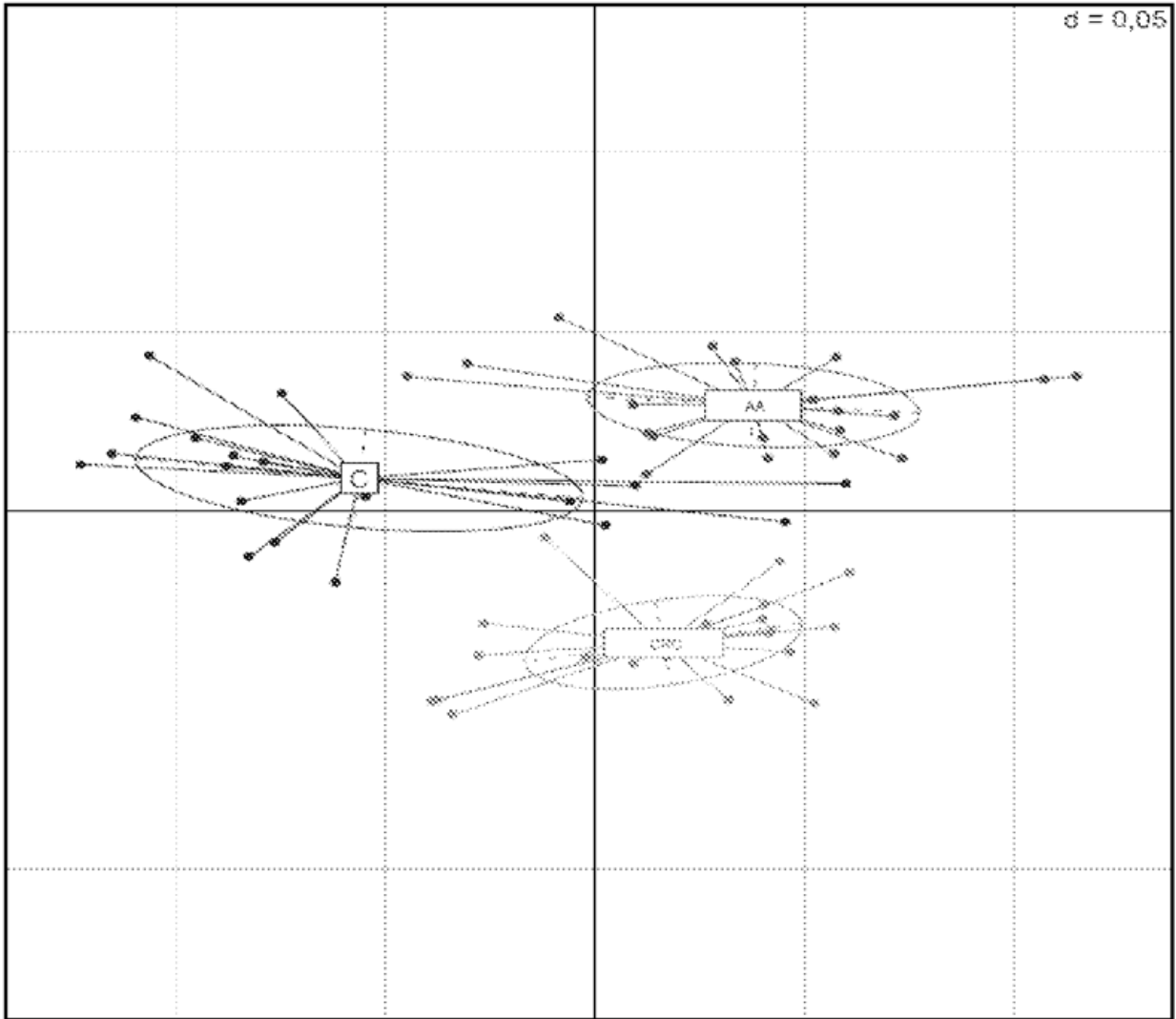


FIG. 2

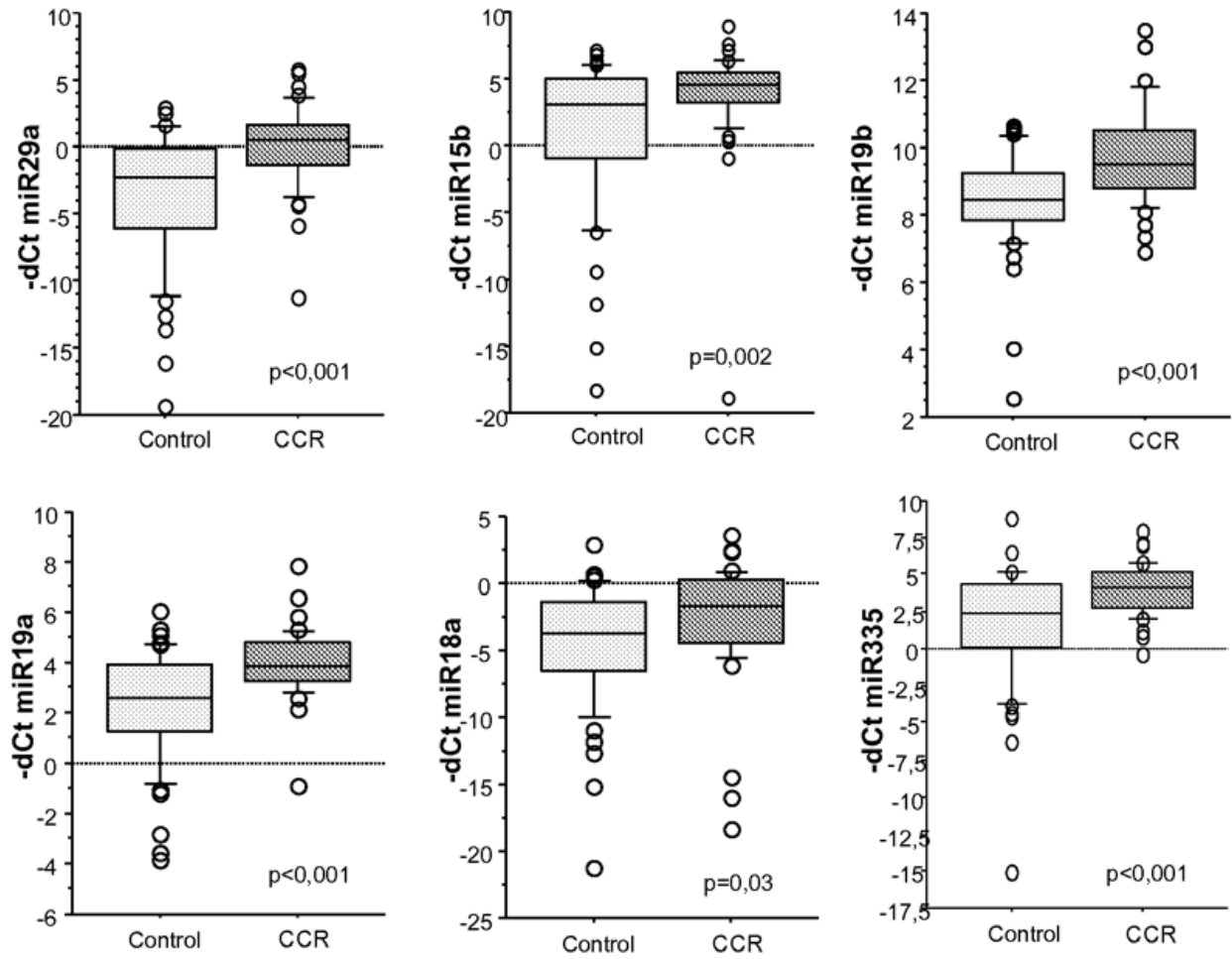


FIG. 3

FIG. 4A Firma de miR19a+miR19b

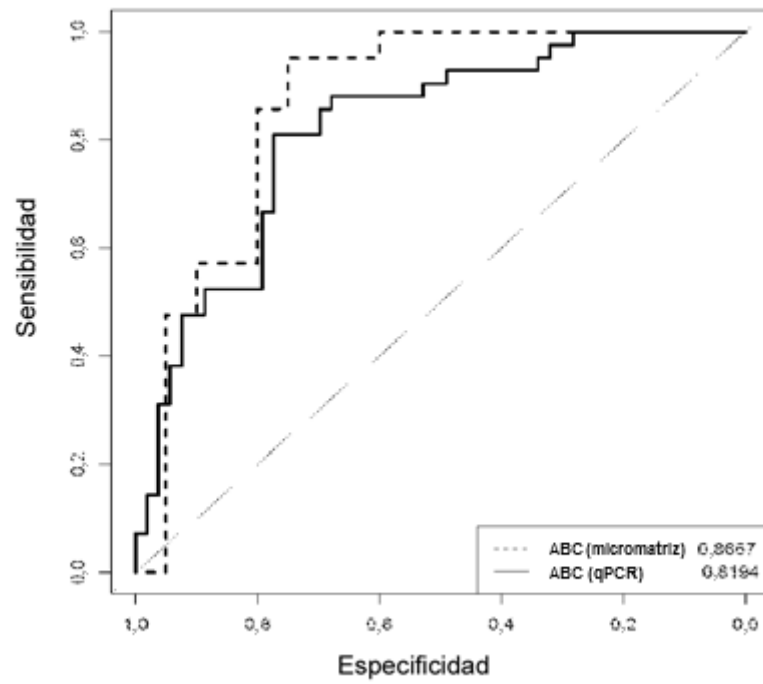


FIG. 4B Firma de miR19a+miR19b+miR15b

