

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 825**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/197** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)  
**A61K 31/4168** (2006.01)  
**A61K 31/4745** (2006.01)  
**A61K 31/513** (2006.01)  
**A61K 31/555** (2006.01)  
**A61K 31/7068** (2006.01)  
**A61K 31/7072** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61P 35/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2013 PCT/US2013/067860**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14071067**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2013 E 13851439 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2914344**

54 Título: **Tratamiento de cáncer de colon metastásico**

30 Prioridad:

**31.10.2012 US 201261720912 P**  
**15.03.2013 US 201361786500 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.09.2020**

73 Titular/es:

**THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)**  
**1230 York Avenue**  
**New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**TAVAZOIE, SOHAIL y**  
**LOO, JIA, MIN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 782 825 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**

Tratamiento de cáncer de colon metastásico

**5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/720.912 presentada el 31 de octubre de 2012 y la solicitud provisional estadounidense n.º 61/786.500 presentada el 15 de marzo de 2013.

**10 Intereses del gobierno**

La invención dada a conocer en el presente documento se realizó, al menos en parte, con apoyo gubernamental con la subvención n.º 1 DP2 OD006506-01 de los National Institutes of Health. Por consiguiente, el gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

**15 Campo de la invención**

Esta invención se refiere al diagnóstico y tratamiento de cáncer de colon.

**20 Antecedentes de la invención**

El cáncer de colon, comúnmente conocido como cáncer colorrectal o cáncer de intestino, es un cáncer de crecimiento celular incontrolado en el colon o el recto, o en el apéndice. Véase, por ejemplo, Cancer Genome Atlas Network, "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer," *Nature* 487: 330-337 (19 de julio de 2012). Es el segundo tumor maligno más frecuentemente diagnosticado en los Estados Unidos y la segunda causa más común de muerte por cáncer. Por ejemplo, la tasa de supervivencia a los cinco años para pacientes con cáncer colorrectal detectado en un estado localizado temprano es del 92% mientras que la tasa de supervivencia cae hasta el 64% si se permite que el cáncer se disemine a ganglios linfáticos u órganos adyacentes, y hasta el 7% en pacientes con metástasis distantes.

El pronóstico de la prognosis de cáncer de colon está directamente relacionado con el grado de penetración del tumor a través de la pared intestinal y la presencia o ausencia de implicación ganglionar. En consecuencia, son importantes la detección y el tratamiento tempranos. Actualmente, el diagnóstico se ve ayudado por el uso de ensayos de examen para detectar sangre oculta fecal, sigmoidoscopia, colonoscopia y enemas de bario de contraste doble. Los regímenes de tratamiento, tal como se determinan mediante el tipo y estadio del cáncer, incluyen cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. Sin embargo, la recaída tras la cirugía (la forma más común de terapia) es un problema importante y a menudo la causa última de la muerte. A pesar de la investigación en terapias para la enfermedad, el cáncer de colon sigue siendo difícil de diagnosticar y tratar. Por tanto, existe la necesidad de nuevos agentes y métodos para detectar y tratar cáncer de colon.

Ohiri *et al.*, 1995, *Biochimica et Biophysica Acta*, 367-372 dan a conocer los efectos de la creatina y el ácido  $\beta$ -guanidinopropiónico sobre el crecimiento de células tumorales de ascitis de Ehrlich.

Gustave *et al.*, 1996, *Oncology Research*, 8: 121-130 dan a conocer análogos de creatina y fosfocreatina.

El documento WO92/08456 A2 da a conocer un método de inhibición de la transformación, el crecimiento y la metástasis de células en las que la actividad enzimática metabólica de la purina está elevada.

Georg *et al.*, 2005, *BMC Gastroenterology*, 5:9, dan a conocer la actividad creatinina cinasa elevada en carcinoma hepatocelular primario.

Martin, *et al.*, 1996, *International Journal of Oncology*, dan a conocer la selección como diana específica de células tumorales mediante el análogo de creatina ciclocreatina.

Lille *et al.*, 1993, *Cancer Research*, 3172-3178 dan a conocer ciclocreatina que inhibe el crecimiento de un amplio espectro de células cancerosas derivadas de tumores sólidos.

**Sumario de invención**

60 En un aspecto, la invención proporciona un compuesto que es ácido beta-guanidinopropiónico para su uso en un método de tratamiento de cáncer de colon metastásico, en el que el método comprende la supresión de la colonización metastásica de dicho cáncer de colon metastásico.

65 La descripción presenta un método para tratar cáncer de colon (por ejemplo, cáncer de colon metastásico) en un sujeto que lo necesita. El método incluye aumentar en el sujeto el nivel de expresión de un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-483-5p y miR-551a. La etapa de aumentar puede llevarse a cabo administrando al

- 5 sujeto un ácido nucleico que codifica para miR-483-5p o miR-551a. El ácido nucleico puede ser un oligonucleótido, por ejemplo, un ácido nucleico sintético. El ácido nucleico puede ser un vector, tal como uno seleccionado del grupo que consiste en un plásmido, virus, cósmido, cromosoma artificial y otros vehículos derivados de fuentes bacterianas y/o virales. Los ejemplos del virus incluyen virus adenoasociado (VAA) o virus de la viruela. El virus adenoasociado o virus de la viruela puede modificarse para aumentar su actividad, estabilidad o especificidad. En algunos ejemplos, el ácido nucleico contiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 1-10 o el complemento de la misma. El método puede incluir además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional tal como se da a conocer en el presente documento.
- 10 La descripción proporciona un agente de interferencia por ARN (iARN) aislado capaz de inhibir la expresión de creatinina cinasa de tipo cerebral (CKB) o canal de transportador de creatinina SLC6a8 (SLC6a8). El agente contiene una primera secuencia de nucleótidos que es homóloga o complementaria a una región de un gen que codifica para la proteína CKB o SLC6a8. En algunos ejemplos, la primera secuencia de nucleótidos incluye la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 11-18.
- 15 La descripción también proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica para el agente de iARN mencionado anteriormente y un vector que tiene el ácido nucleico. El vector puede ser uno seleccionado del grupo que consiste en un plásmido, virus, cósmido, cromosoma artificial y otros vehículos derivados de fuentes bacterianas y/o virales. Preferiblemente, el vector es un vector viral, por ejemplo, un vector viral de VAA. También se proporciona una célula huésped que tiene el agente de iARN, ácido nucleico o vector mencionado anteriormente. Se proporciona además una composición farmacéutica que tiene (a) un portador farmacéuticamente aceptable y (b) el agente de iARN, el ácido nucleico o el vector. El agente de iARN, el ácido nucleico o el vector puede complejarse con otros agentes, por ejemplo, compuestos liposomales o polietilamina, para un suministro eficaz. En una realización, la composición farmacéutica contiene además un agente terapéutico adicional.
- 20 La descripción presenta un método para tratar el cáncer, tal como cáncer de colon (por ejemplo, cáncer de colon metastásico) o cáncer pancreático en un sujeto que lo necesita. El método incluye disminuir en el sujeto el nivel de expresión o actividad de CKB o SLC6a8). La etapa de disminuir puede llevarse a cabo administrando al sujeto un ácido nucleico, un compuesto de molécula pequeña, o ambos. En un ejemplo, la etapa de disminuir se lleva a cabo administrando al sujeto ciclocreatina o ácido beta-guanidinopropiónico. En otros, la etapa de disminuir se lleva a cabo administrando al sujeto un agente seleccionado del grupo que consiste en el agente de iARN descrito anteriormente, ácido nucleico y vector. En algunas realizaciones, el método incluye además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional, tal como ácido beta-guanidinopropiónico.
- 30 La descripción también presenta un método para tratar el cáncer tal como cáncer de colon y cáncer pancreático en un sujeto que lo necesita. El método incluye disminuir en el sujeto el nivel de creatina a través de la inhibición del canal de transportador de creatinina SLC6a8. El método incluye administrar al sujeto ácido beta-guanidinopropiónico y, opcionalmente, un agente terapéutico adicional. Los ejemplos del agente terapéutico adicional incluyen uno o más seleccionados del grupo que consiste en la ciclocreatina, agente de iARN, ácido nucleico y vector mencionados anteriormente. Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos adicionales incluyen 5-fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecán, capecitabina, gemcitabina, cetuximab, Taxol, Avastin, ácido folínico (leucovorina), regorafenib, Zaltrap, inhibidores de topoisomerasa I, NKTR-102, tivantinib, PX-866, sorafenib, linifanib, inhibidores de cinasas, telatinib, XL281 (BMS-908662), robatumumab e inhibidores de IGF1-R.
- 40 La descripción proporciona un método para determinar si un sujeto tiene, o corre el riesgo de tener, cáncer de colon metastásico. El método incluye (i) obtener del sujeto una muestra; (ii) medir en la muestra el nivel de expresión de un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-483-5p y miR-551a; y (ii) comparar el nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado. Se determina que el sujeto tiene, o corre el riesgo de tener, cáncer de colon metastásico si el nivel de expresión está por debajo del valor de referencia predeterminado. El valor de referencia predeterminado puede obtenerse de un sujeto de control que no tiene cáncer de colon metastásico. La muestra puede ser una muestra de líquido corporal o una muestra tumoral de biopsia. El método puede usarse también para determinar si un sujeto tiene, o corre el riesgo de tener, recaída de cáncer de colon metastásico, o para determinar si un sujeto tiene, o corre el riesgo de tener, cáncer de colon o cáncer de colon metastásico que es resistente a agentes quimioterápicos o terapias dirigidas. Más específicamente, se determina que el sujeto tiene, o corre el riesgo de tener recaída de cáncer de colon metastásico, o cáncer de colon o cáncer de colon metastásico que es resistente a agentes quimioterápicos o terapias dirigidas, si el nivel de expresión está por debajo del valor de referencia predeterminado.
- 50 La descripción proporciona un alineamiento que tiene (i) un soporte que tiene una pluralidad de ubicaciones únicas y (ii) cualquier combinación de al menos un ácido nucleico que tiene una secuencia que es complementaria a miR-483-5p, miR-551a o un producto de expresión (por ejemplo, ARNm o ADNc relacionado) del gen que codifica para CKB o SLC6a8. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser complementario a o, en una condición de hibridación rigurosa, hibridarse con una de SEQ ID NO: 1-18. Cada ácido nucleico está inmovilizado en una ubicación única del soporte.
- 60
- 65

La descripción también proporciona un kit para diagnosticar el potencial metastásico del cáncer de colon en un sujeto, el potencial de que el cáncer de colon metastásico reaparezca, el potencial de que el cáncer de colon metastásico progrese rápidamente o el potencial de que el cáncer de colon metastásico presente resistencia a la quimioterapia. El kit contiene un reactivo que se une específicamente a miR-483-5p, miR-551a, o un producto de expresión (por ejemplo, ARNm, ADNc y polipéptido) del gen que codifica para CKB o SLC6a8. El agente puede ser una sonda que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de miR-483-5p y miR-551a. Por ejemplo, cada sonda puede tener una secuencia que es complementaria a o, en una condición de hibridación rigurosa, se hibrida con una de SEQ ID NO: 1-18. El kit puede incluir además reactivos para realizar un ensayo de hibridación o un ensayo de PCR o el alineamiento mencionado anteriormente.

La descripción proporciona un método de identificación de un compuesto útil para tratar cáncer de colon o para inhibir la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas. El método incluye (i) obtener una célula de prueba que expresa un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-483-5p y miR-551a; (ii) exponer la célula de prueba a un compuesto de prueba; (iii) medir el nivel de expresión del microARN en la célula de prueba; (iv) comparar el nivel de expresión con un nivel de control; y (v) seleccionar el compuesto de prueba como candidato útil para tratar cáncer de colon o para inhibir la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas, si la comparación indica que el nivel de expresión es mayor que el nivel de control.

La descripción también proporciona un método de identificación de un compuesto útil para tratar cáncer de colon o para inhibir la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas. El método incluye (i) obtener una célula de prueba capaz de expresar un polipéptido o ARNm de un gen seleccionado del grupo que consiste en CKB o SLC6a8; (ii) exponer la célula de prueba a un compuesto de prueba; (iii) medir el nivel de expresión del gen en la célula de prueba; (iv) comparar el nivel de expresión con un nivel de control; y (v) seleccionar el compuesto de prueba como candidato útil para tratar cáncer de colon o para inhibir la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas, si la comparación indica que el nivel de expresión es menor que el nivel de control.

En los métodos descritos anteriormente, el nivel de control puede obtenerse a partir de una célula de control que es la misma que la célula de prueba excepto porque la célula de control no se ha expuesto al compuesto de prueba. La célula de prueba puede ser una célula de una línea celular de cáncer de colon, por ejemplo, línea de cáncer de colon humano LS-174T. En algunas realizaciones, el nivel de expresión del gen puede medirse usando un constructo indicador donde un gen indicador (por ejemplo, uno que codifica para luciferasa, GFP o LacZ) está operativamente unido a un promotor del gen que codifica para el miR-483-5p, miR-551a, CKB o SLC6a8 mencionado anteriormente.

Esta invención proporciona además un método para tratar cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer de próstata, cáncer de sarcoma, melanoma o cáncer de pulmón en un sujeto que lo necesite. El método incluye, entre otros, administrar al sujeto ácido beta-guanidinopropiónico.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-E son un conjunto de diagramas y fotografías que muestran que miR-483-5p, miR-551a y CKB son clínicamente relevantes y pueden inhibirse terapéuticamente, a, se cuantificaron los niveles de miR-483-5p y miR-551a en 37 muestras de tumor primario y 30 muestras de metástasis de hígado mediante PCR cuantitativa en tiempo real. b, se midieron los niveles de expresión de CKB en 37 muestras de tumor primario y 30 muestras de metástasis de hígado mediante PCR cuantitativa en tiempo real. c, metástasis de hígado en ratones en los que se inyectaron células LvM3b y se trataron con una sola dosis de VAA que expresa doblemente miR-483-5p y miR-551a un día después de las células de inyección, d, mediciones bioluminiscentes de metástasis de hígado en ratones en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células LvM3b y se trataron con ciclocreatina diariamente durante dos semanas. Se sacrificaron los ratones y se extirparon los hígados para obtención de imágenes *ex vivo* al final del tratamiento, e, mediciones bioluminiscentes de metástasis de hígado en ratones en los que se inyectaron con  $5 \times 10^5$  células LvM3b y se trataron con el inhibidor del transportador de creatina ácido beta-guanidinopropiónico (B-GPA) diariamente durante dos semanas. Barras de error, e.e.m.; todos los valores de P se basan en pruebas de la t de Student unilaterales. \* P < 0,05; \*\* P < 0,001; \*\*\* P < 0,0001.

La figura 2 es un conjunto de un diagrama y una fotografía que muestra que el tratamiento con B-GPA suprimió la metástasis del cáncer colorrectal. Mediciones bioluminiscentes de metástasis de hígado en ratones en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células LvM3b y se trataron con B-GPA diariamente durante tres semanas. Los ratones se sacrificaron a las tres semanas y se extrajo el hígado para la obtención de imágenes bioluminiscentes e histología macroscópica. Las barras de error representan el e.e.m.; todos los valores de P se basan en pruebas de la t de Student unilaterales. \* P < 0,05.

Las figuras 3A-C son un conjunto de diagramas y fotografías que muestran que el transportador de creatina, SLC6a8, se requiere para la metástasis de cáncer colorrectal y pancreático, a) metástasis de hígado por células LvM3b altamente agresivas que expresan horquillas cortas que seleccionan como diana el canal de transportador de creatina, SLC6a8. La metástasis de hígado se monitorizó mediante obtención de imágenes bioluminiscentes y los ratones se sacrificaron tres semanas después de la inoculación de células cancerosas. Se extrajeron los hígados para la histología macroscópica, b) metástasis de hígado en ratones en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células SW480 transducidas con un ARNhp que selecciona como diana SLC6a8. La progresión metastásica se monitorizó mediante obtención de imágenes bioluminiscentes. Los ratones se sacrificaron 28 días después de la inyección y los hígados se extirparon para la obtención de imágenes bioluminiscentes e histología macroscópica, c) metástasis de hígado en ratones en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células de cáncer pancreático PANC1 transducidas con un ARNhp que selecciona como diana SLC6a8. La progresión metastásica se monitorizó mediante la obtención de imágenes bioluminiscentes y los ratones se sacrificaron tal como se describió anteriormente. Las barras de error representan el e.e.m; todos los valores de P se basan en pruebas de la t de Student unilaterales. \* P <0,05; \*\* P <0,001; \*\*\* P <0,0001.

La figura 4 es un diagrama que muestra que SLC6a8 está regulado por incremento en metástasis de hígado en comparación con tumores primarios. La expresión de SLC6a8 en 36 tumores primarios y 30 metástasis de hígado se cuantificó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Las barras de error representan el e.e.m; todos los valores de P se basan en pruebas de la t de Student unilaterales. \* P <0,05.

La figura 5 es un conjunto de un diagrama y una fotografía que muestran que el tratamiento con B-GPA suprime la supervivencia de células de cáncer pancreático PANC1 diseminadas en el hígado *in vivo*. Obtención de imágenes de bioluminiscencia de ratones inmunodeficientes en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células PANC1 con y sin pretratamiento con B-GPA 10 mM durante 48 h. Se obtuvieron imágenes de los ratones el día 1 después de la inyección y la señal se normalizó al día cero. Los valores de P se basan en pruebas de la t de Student unilaterales. \* P <0,05.

La figura 6 es un diagrama que muestra que B-GPA potencia la citotoxicidad de gemcitabina en células de cáncer pancreático PANC1. Viabilidad celular de células de cáncer pancreático PANC1 después del tratamiento con dosis crecientes de gemcitabina sola o dosis crecientes de gemcitabina en combinación con B-GPA 10 mM. La viabilidad celular se sometió a ensayo usando el reactivo WST-1. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La figura 7 es un diagrama que muestra que B-GPA potencia la citotoxicidad de 5'-fluorouracilo en células de cáncer colorrectal LS-LvM3b. Viabilidad celular de células LS-LvM3b después del tratamiento con dosis crecientes de 5'-fluorouracilo solo o dosis crecientes de 5'-fluorouracilo en combinación con B-GPA 10 mM. La viabilidad celular se sometió a ensayo usando el reactivo WST-1. Las barras de error representan el error estándar de la media.

#### 40 Descripción detallada de la invención

La invención se basa, al menos en parte, en los descubrimientos inesperados de que una red cooperativa de miARN-proteína está desregulada en la colonización del hígado por cáncer de colon metastásico y que miARN, por ejemplo, miR-483-5p y miR-551a, suprimen la supervivencia metastásica del cáncer de colon seleccionando como diana cooperativamente la energética dependiente de creatinina cinasa cerebral.

Por consiguiente, esta invención proporciona un compuesto que es ácido beta-guanidinopropiónico para su uso en un método de tratamiento de cáncer de colon metastásico, en el que el método comprende la supresión de la colonización metastásica de dicho cáncer de colon metastásico.

La colonización de un órgano por células cancerosas diseminadas representa el estadio final, más clínicamente significativo y menos entendido de la progresión del cáncer. El hígado es un órgano sumamente común para tal colonización metastásica por muchos tipos de cáncer. Para entender la base molecular de la colonización del hígado, se estableció un modelo de selección *in vivo* de la colonización del hígado por cáncer de colon. Es un sistema poderoso ya que acopla una selección *in vivo* competitiva dentro del órgano con la obtención del perfil de ARN pequeño para evaluar funcionalmente los papeles *in vivo* de 611 microARN en paralelo durante la colonización del hígado. Tal como se da a conocer en el presente documento, se identificaron miR-483-5p y miR-551a endógenos como supresores robustos de la colonización metastásica del hígado por múltiples poblaciones de cáncer de colon de diversos antecedentes mutacionales. Estos miARN están silenciados epigenéticamente en células metastásicas y en metástasis de hígado humanas y suprimen la metástasis seleccionando como diana la creatinina cinasa de tipo cerebral (CKB).

Tal como se da a conocer en el presente documento, CKB promueve la metástasis potenciando la supervivencia de células cancerosas diseminadas en el hígado, donde se encuentran con hipoxia hepática. La supervivencia del cáncer de colon depende de la producción por CKB de fosfo-creatina, que actúa como depósito energético para generar ATP necesario para soportar la hipoxia hepática. Consecuente con esto, la inhibición de la captación de

creatina por células cancerosas a través de la inactivación del transportador de creatina también reduce la metástasis. La administración terapéutica de miR-483-5p y miR-551 a través de suministro por virus adenoasociados suprime drásticamente la metástasis de cáncer de colon. Adicionalmente, la selección como diana terapéutica de CKB con un inhibidor de molécula pequeña suprime significativamente la metástasis de cáncer de colon. Estos resultados destacan la significación de la energética metabólica en el mantenimiento de la supervivencia metastásica durante la progresión del cáncer. Los hallazgos dados a conocer en el presente documento tienen importantes implicaciones para el tratamiento de tumores malignos gastrointestinales, que colonizan preferentemente el hígado y se cobran las vidas de más de 500.000 personas al año. Además, el enfoque de examen/selección *in vivo* dado a conocer en el presente documento tiene el potencial de identificar rápida y exhaustivamente genes codificantes y no codificantes que regulan la colonización de cualquier órgano por cualquier tipo de cáncer.

Tal como se da a conocer en el presente documento, por medio del enfoque mencionado anteriormente, se identificaron un conjunto de miARN que estaban desregulados en líneas metastásicas humanas de cáncer de colon. Tal como se da a conocer en el presente documento, miR-483-5p y miR-551a actúan como robustos supresores endógenos de la metástasis de cáncer de colon a través de la selección como diana convergente del gen metabólico creatinina cinasa de tipo cerebral (CKB). Estos miARN presentan una capacidad de pronóstico significativa en la identificación de pacientes que desarrollan recidiva metastásica de cáncer de colon, mientras que la administración terapéutica de estos miARN inhibe significativamente la metástasis de cáncer de colon. Los miembros de la red de miARN-proteína dados a conocer en el presente documento pueden usarse como dianas para tratar cáncer de colon metastásico. Además, los miembros pueden usarse como biomarcadores para determinar si un sujeto tiene, o corre el riesgo de tener, un cáncer de colon metastásico o para determinar un pronóstico o la vigilancia de un paciente que tiene el trastorno. Por consiguiente, la presente descripción abarca métodos de tratamiento de cáncer de colon metastásico seleccionando como diana uno o más de los miembros, métodos de determinación de la eficacia de regímenes terapéuticos para inhibir el cáncer y métodos de identificación de agentes anticancerígenos. También se proporcionan métodos de diagnóstico de si un sujeto tiene, o corre el riesgo de tener, cáncer de colon metastásico, y métodos de examen de sujetos que se cree que corren el riesgo de desarrollar el trastorno. La descripción también abarca diversos kits adecuados para llevar a cabo los métodos mencionados anteriormente.

### Métodos de tratamiento

Tal como se da a conocer en el presente documento, se identificaron miR-483-5p y miR-551a como supresores de metástasis endógenos de la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas en cáncer de colon y otros tipos de cánceres al tiempo que CKB y el canal de transportador de creatinina SLC6a8 funcionan como promotores de la metástasis del mismo proceso. Estos miARN o proteínas no solo predicen fuertemente los desenlaces metastásicos humanos, sino que también proporcionan dianas para tratar cánceres tales como cáncer de colon y otros tipos de cánceres.

Por consiguiente, esta descripción proporciona métodos de uso de agentes relacionados, incluyendo, microARN, agentes de iARN que seleccionan como diana CKB, agentes de iARN que seleccionan como diana SLC6a8, vectores (por ejemplo, VAA) que codifican para un agente de iARN de este tipo, ciclocreatina y ácido guanidinopropiónico en el tratamiento de cánceres tales como cáncer de colon y otros tipos de cánceres por medio del aumento en el sujeto del nivel de expresión o nivel de actividad de uno o más de los supresores de metástasis. Este aumento puede lograrse mediante, entre otros, expresión forzada de uno o más de los supresores de metástasis. Además, el tratamiento puede lograrse disminuyendo el nivel de expresión o nivel de actividad de uno o más de los promotores de metástasis. Los ejemplos de otros tipos de cánceres incluyen tumores sólidos, particularmente carcinomas. Los tumores sólidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinomas del pulmón, mama, hueso, ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parótida, tracto biliar, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroides, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células pequeñas, mesotelioma, melanomas, mieloma, linfoma, gliomas, glioblastomas, neuroblastomas, sarcoma de Kaposi y sarcomas. En particular, los métodos de esta descripción pueden usarse en el tratamiento de cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer del tracto biliar y cáncer de mama.

### *Expresión forzada de supresores de metástasis*

Tanto miR-483-5p y miR-551a como el ácido nucleico que los codifica pueden usarse como supresores de metástasis para poner en práctica la invención mediante la sobreexpresión de los mismos en células de interés o un sujeto que lo necesita.

“Sobreexpresión” se refiere a la expresión de un ARN o polipéptido codificado por un ácido nucleico introducido en una célula huésped, en el que el ARN o polipéptido o proteína o bien no está presente normalmente en la célula huésped, o bien en el que el ARN o polipéptido está presente en dicha célula huésped a un nivel mayor que el normalmente expresado a partir del gen endógeno que codifica para el ARN o polipéptido.

Todas las versiones que se producen de manera natural, versiones modificadas por ingeniería genética y versiones

sintetizadas químicamente de los supresores mencionados anteriormente pueden usarse para poner en práctica la invención dada a conocer en la misma. Para expresar los supresores mencionados anteriormente, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica para cualquiera de los supresores mencionados anteriormente. Preferiblemente, las secuencias de nucleótidos se aíslan y/o se purifican. Un ácido nucleico se refiere a una molécula de ADN (por ejemplo, un ADNc o ADN genómico), una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) o un análogo de ADN o ARN. Un análogo de ADN o ARN puede sintetizarse a partir de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser mono o bicatenaria. Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de cualquier ácido nucleico que se produce de manera natural o a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico que se produce de manera natural. El término cubre por tanto, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómico que se produce de manera natural pero no está flanqueada por ambas de las secuencias codificantes que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que se produce de manera natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote de una manera tal que la molécula resultante no es idéntica a cualquier ADN genómico o de vector que se produce de manera natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica para una proteína de fusión.

Los términos "ARN", "molécula de ARN" y "molécula de ácido ribonucleico" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un polímero de ribonucleótidos. El término "ADN" o "molécula de ADN" o "molécula de ácido desoxirribonucleico" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN y el ARN pueden sintetizarse de manera natural (por ejemplo, mediante replicación de ADN o transcripción de ADN, respectivamente). El ARN puede modificarse postranscripcionalmente. El ADN y el ARN también pueden sintetizarse químicamente. El ADN y el ARN pueden ser monocatenarios (es decir, ARNmc y ADNmc, respectivamente) o multicatenarios (por ejemplo, bicatenarios, es decir, ARNBC y ADNmc, respectivamente).

La presente descripción también proporciona constructos recombinantes que tienen una o más de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. Los ejemplos de los constructos incluyen un vector, tal como un vector viral o de plásmido, en el que se ha insertado una secuencia de ácido nucleico de la invención, en una orientación directa o inversa. En una realización preferida, el constructo incluye además secuencias reguladoras, incluyendo un promotor, operativamente unido a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen grandes números de vectores y promotores adecuados, y están disponibles comercialmente. También se describen vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con huéspedes procariontes y eucariotes en Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press).

Ejemplos de vectores de expresión incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo, derivados del virus de simios 40 (SV40), plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral como vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar y pseudorrabia. Sin embargo, puede usarse cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en el huésped. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, una secuencia de ácido nucleico que codifica para uno de los supresores descritos anteriormente puede insertarse en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados mediante procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos y procedimientos de subclonación relacionados están dentro del alcance de los expertos en la técnica.

La secuencia de ácido nucleico en el vector de expresión mencionado anteriormente está preferiblemente unida operativamente a una secuencia de control de la transcripción apropiada (promotor) para dirigir la síntesis de ARN. Los ejemplos de tales promotores incluyen: el promotor terminal retroviral largo (LTR) o SV40, el promotor de *E. coli* lac o trp, el promotor de fago lambda PL y otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células o virus procariontes o eucariotes. El vector de expresión también puede contener un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, el vector de expresión contiene preferiblemente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tal como resistencia a neomicina o dihidrofolato reductasa para cultivos de células eucariotes, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El vector que contiene las secuencias de ácido nucleico apropiadas descritas anteriormente, así como una secuencia de control o promotor apropiada, puede emplearse para transformar un huésped apropiado para permitir que el huésped exprese el supresor descrito anteriormente. Tales vectores pueden usarse en terapia génica. Los ejemplos de huéspedes de expresión adecuados incluyen células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*), células fúngicas (levadura), células de insectos (por ejemplo, *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda* (Sf9)), células animales (por ejemplo, CHO, COS y HEK 293), adenovirus y células vegetales. La selección de un huésped apropiado está dentro del alcance de los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos para producir el supresor mencionado anteriormente mediante la transfección de una célula huésped con un vector de expresión que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica para uno de los supresores.

*Disminución de la expresión o nivel de actividad de promotores de metástasis*

Tal como se mencionó anteriormente, puede usarse un agente inhibidor que disminuye la expresión o el nivel de actividad de CKB o SLC6a8 en el tratamiento de cáncer de colon. Un agente inhibidor (es decir, inhibidor) puede ser un ácido nucleico, un polipéptido, un anticuerpo o un compuesto de molécula pequeña. En un ejemplo, el inhibidor funciona al nivel de transcripción, estabilidad de mRNA, traducción, estabilidad/degradación de proteínas, modificación de proteínas y unión de proteínas.

Un inhibidor de ácido nucleico puede codificar para ARN de interferencia pequeño (por ejemplo, un agente de iARN) que selecciona como diana uno o más de los genes mencionados anteriormente, por ejemplo, CKB o SLC6a8, e inhibe su expresión o actividad. El término "agente de iARN" se refiere a un ARN, o análogo del mismo, que tiene suficiente complementariedad de secuencia con un ARN diana como para dirigir la interferencia de ARN. Los ejemplos también incluyen un ADN que puede usarse para producir el ARN. La interferencia de ARN (iARN) se refiere a un proceso selectivo o específico de secuencia mediante el cual una molécula diana (por ejemplo, un gen, proteína o ARN diana) se regula por disminución. En general, un ARN de interferencia ("ARNi") es un ARN de interferencia corto bicatenario (ARNic), ARN en horquilla corto (ARNhc) o micro-ARN monocatenario (miARN) que da como resultado degradación catalítica de ARNm específicos, y también puede usarse para disminuir o inhibir la expresión génica.

El término "ARN de interferencia corto" o "ARNic" (también conocido como "ARN de interferencia pequeño") se refiere a un agente de ARN, preferiblemente un agente bicatenario, de aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud, preferiblemente entre aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud, teniendo las hebras opcionalmente extremos sobresalientes que comprenden, por ejemplo, 1, 2 o 3 nucleótidos sobresalientes (o análogos de nucleótidos), que es capaz de dirigir o mediar en la interferencia de ARN. Los ARNic que se producen de manera natural se generan a partir de moléculas de ARNbc más largas (por ejemplo, > 25 nucleótidos de longitud) mediante la maquinaria de iARN de una célula (por ejemplo, Dicer o un homólogo del mismo).

El término "miARN" o "microARN" se refiere a un agente de ARN, preferiblemente un agente monocatenario, de aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud, preferiblemente entre aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud, que es capaz de dirigir o mediar en la interferencia de ARN. Los miARN que se producen de manera natural se generan a partir de ARN precursores de tallo-bucle (es decir, pre-miARN) por Dicer. El término "Dicer", tal como se usa en el presente documento, incluye Dicer, así como cualquier ortólogo u homólogo de Dicer capaz de procesar estructuras de ARNbc para dar ARNic, miARN, moléculas de tipo ARNic o de tipo miARN. El término microARN (o "miARN") se usa de manera intercambiable con el término "ARN temporal pequeño" (o "ARNtp") basándose en el hecho de que se ha encontrado que los microARN que se producen de manera natural (o "miARN") se expresan de forma temporal (por ejemplo, durante el desarrollo).

El término "ARNhc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente de ARN que tiene una estructura de tallo-bucle, que comprende una primera y segunda región de secuencia complementaria, siendo el grado de complementariedad y orientación de las regiones suficiente de manera que se produce emparejamiento de bases entre regiones, estando unidas las regiones primera y segunda por una región de bucle, resultando el bucle de una falta de apareamiento de bases entre nucleótidos (o análogos de nucleótidos) dentro de la región de bucle.

Dentro del alcance de esta descripción se encuentra la utilización de iARN que presenta degradación de moléculas de ARN (por ejemplo, dentro de una célula). La degradación está catalizada por un complejo de silenciamiento enzimático, inducido por ARN (RISC). Un agente de ARN que tiene una secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARN diana (por ejemplo, el gen CKB o SLC6a8 mencionado anteriormente) como para dirigir el iARN significa que el agente de ARN tiene una homología de al menos el 50% (por ejemplo, el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de homología) con la secuencia de ARN diana de modo que las dos sean lo suficientemente complementarias entre sí como para hibridarse y desencadenar la destrucción del ARN diana por la maquinaria o el proceso de iARN (por ejemplo, el complejo RISC). Un agente de ARN que tiene una "secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARN diana como para dirigir el iARN" también significa que el agente de ARN tiene una secuencia suficiente para desencadenar la inhibición traduccional del ARN diana por la maquinaria o el proceso de iARN. Un agente de ARN también puede tener una secuencia suficientemente complementaria a un ARN diana codificado por la secuencia de ADN diana de manera que la secuencia de ADN diana se silencia cromáticamente. En otras palabras, el agente de ARN tiene una secuencia suficiente para inducir silenciamiento génico transcripcional, por ejemplo, para modular por disminución la expresión génica en o cerca de la secuencia de ADN diana, por ejemplo, induciendo cambios estructurales de la cromatina en o cerca de la secuencia de ADN diana.

Los polinucleótidos mencionados anteriormente pueden suministrarse usando dispositivos de suministro de micropartículas o microcápsulas poliméricas, biodegradables conocidos en la técnica. Otra forma de lograr la captación de los polinucleótidos es usando liposomas, preparados por métodos convencionales. El polinucleótido puede incorporarse solo en estos vehículos de suministro o incorporarse conjuntamente con anticuerpos específicos

de tejido. Alternativamente, puede prepararse un conjugado molecular compuesto por un plásmido u otro vector unido a la poli-L-lisina por fuerzas electrostáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que puede unirse a un receptor en las células diana (Cristiano, *et al.*, 1995, J. Mol. Med. 73:479) Alternativamente, puede lograrse direccionamiento específico de tejido mediante el uso de elementos reguladores de la transcripción específicos de tejido que se conocen en la técnica. El suministro de ADN desnudo (es decir, sin un vehículo de suministro) a un sitio intramuscular, intradérmico o subcutáneo es otro medio para lograr la expresión *in vivo*.

Las moléculas ARNic, miARN y ARNas (ARN antisentido) pueden diseñarse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Pueden diseñarse moléculas de ARNic, miARN y ARNas con homología suficiente para proporcionar la especificidad de secuencia requerida para degradar exclusivamente cualquier ARN usando programas conocidos en la técnica, incluyendo los mantenidos en los sitios web de AMBION, Inc. y DHARMA CON, Inc. Los expertos en la técnica pueden realizar de manera rutinaria pruebas sistemáticas de varias especies diseñadas para la optimización de la secuencia ARNic, miARN y ARNas. Las consideraciones al diseñar moléculas de ácido nucleico de interferencia cortas incluyen, pero no se limitan a, consideraciones biofísicas, termodinámicas y estructurales, preferencias de bases en posiciones específicas en la hebra de sentido y homología. Estas consideraciones se conocen bien en la técnica y proporcionan directrices para diseñar las moléculas de ARN mencionadas anteriormente.

Un polinucleótido antisentido (preferiblemente ADN) de la presente descripción puede ser cualquier polinucleótido antisentido siempre que presente una secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria a la del gen que codifica para un componente de la red mencionada anteriormente. La secuencia de bases puede tener al menos aproximadamente el 70%, 80%, 90% > o 95% de homología con el complemento del gen que codifica para el polipéptido. Estos ADN antisentido pueden sintetizarse usando un sintetizador de ADN.

El ADN antisentido de la presente descripción puede contener azúcares, bases o uniones modificados o cambiados. El ADN antisentido, así como el agente de iARN mencionado anteriormente, también pueden proporcionarse en una forma especializada tal como liposomas, microesferas, o pueden aplicarse a terapia génica, o pueden proporcionarse en combinación con restos unidos. Tales restos unidos incluyen policaciones tales como polilisina que actúan como neutralizadores de carga de la estructura principal de fosfato, o restos hidrófobos tales como lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, colesterolos, etc.) que potencian la interacción con las membranas celulares o aumentan la captación del ácido nucleico. Ejemplos preferidos de los lípidos que van a unirse son colesterolos o derivados de los mismos (por ejemplo, cloroformiato de colesterolo, ácido cólico, etc.). Estos restos pueden unirse al ácido nucleico en los extremos 3' o 5' del mismo y también pueden unirse al mismo a través de una unión de base, azúcar o nucleósido intramolecular. Otros restos pueden ser grupos de ocupación de extremos colocados específicamente en los extremos 3' o 5' del ácido nucleico para impedir la degradación por nucleasas tales como exonucleasa, ARNasa, etc. Tales grupos de ocupación de extremos incluyen, pero no se limitan a, grupos protectores de hidroxilo conocidos en la técnica, incluyendo glicoles tales como polietilenglicol, tetraetilenglicol y similares. La acción inhibitoria del ADN antisentido puede examinarse usando un sistema de expresión génica basado en líneas celulares o animales de la presente invención *in vivo* e *in vitro*.

Los ácidos nucleicos que codifican para uno o más de los agentes de iARN mencionados anteriormente o supresores de polipéptidos (que se comentarán a continuación) pueden clonarse en un vector para suministrar a células *in vitro* o *in vivo*. Para usos *in vivo*, el suministro puede dirigirse a un tejido u órgano específico (por ejemplo, hígado o colon). El suministro dirigido implica el uso de vectores (por ejemplo, péptidos de guiado a órganos) que se dirigen a órganos o tejidos específicos después de la administración sistémica. Por ejemplo, el vector puede tener un conjugado covalente de avidina y un anticuerpo monoclonal frente a una proteína específica de hígado.

La presente descripción proporciona métodos para la expresión *in vivo* de los supresores de metástasis mencionados anteriormente. Tal método lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de secuencias de ácido nucleico que codifican para cualquiera de los factores en las células o tejidos de un ser humano o animal no humano que necesita inhibición de la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas. El suministro de las secuencias de ácido nucleico puede lograrse usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Se prefiere el suministro terapéutico de las secuencias de ácido nucleico mediante el uso de liposomas dirigidos.

Diversos vectores virales que pueden utilizarse para la terapia génica dada a conocer en el presente documento incluyen adenovirus, virus adenoasociado (VAA), virus del herpes, vaccinia o, preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus y un lentivirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un lentivirus o un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que puede insertarse un solo gen extraño incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes.

Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que puedan identificarse y generarse células transducidas. Puede hacerse que los vectores retrovirales sean específicos para la diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento preferido se logra mediante

el uso de un anticuerpo específico de diana u hormona que tiene un receptor en la diana. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden insertarse secuencias de polinucleótidos específicos en el genoma retroviral o unirse a una envoltura viral para permitir el suministro específico de diana del vector retroviral.

5 Otro sistema dirigido para el suministro de ácidos nucleicos es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta descripción es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membranas artificiales que son útiles como vehículos de suministro *in vitro* e *in vivo*. Pueden encapsularse ARN, ADN y viriones intactos dentro del interior acuoso y suministrarse a las células en una forma biológicamente activa. En la técnica se conocen métodos para la transferencia eficaz de genes usando un vehículo de liposoma. La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

15 Ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos a modo de ejemplo incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de los liposomas también es posible basándose en, por ejemplo, la especificidad de órganos, especificidad de células y especificidad de orgánulos, y se conoce en la técnica.

20 Cuando se usa *in vivo*, es deseable usar un sistema de suministro-expresión reversible. Con ese fin, pueden usarse el sistema de Cre-loxP o FLP/FRT y otros sistemas similares para el suministro-expresión reversible de uno o más de los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Véanse los documentos WO2005/112620, WO2005/039643, las solicitudes estadounidenses 20050130919, 20030022375, 20020022018, 20030027335 y 20040216178. En particular, puede usarse el sistema de suministro-expresión reversible descrito en la solicitud estadounidense n.º 20100284990 para proporcionar un apagado selectivo o de emergencia.

25 En otro ejemplo, el supresor o agente inhibidor mencionado anteriormente puede ser un polipéptido o un complejo proteico, tal como un anticuerpo o su parte de unión a antígeno, que inhibe o interfiere de otra forma con la actividad de CKB o SLC6a8.

30 El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina o una porción inmunológicamente activa de la misma, es decir, una porción de unión a antígeno. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una proteína que tiene al menos una o dos regiones variables de cadena pesada (H) (VH), y al menos una o dos regiones variables de cadena ligera (L) (VL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina humana reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de región variable de inmunoglobulina.

35 El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o "porción de anticuerpo") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CKB o SLC6a8). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarla fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V<sub>1</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y C<sub>H1</sub>; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H1</sub>; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V<sub>H</sub>; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que les permite que se produzcan como una sola cadena de proteína en la que las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que estén abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se examinan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

45 Pueden prepararse anticuerpos que se unen específicamente a una de las proteínas diana mencionadas anteriormente (por ejemplo, CKB o SLC6a8) usando métodos conocidos en la técnica. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. En una realización, el anticuerpo puede producirse de manera recombinante, por ejemplo, producirse por presentación en fagos o por métodos combinatorios. En otra realización, el anticuerpo es un

anticuerpo completamente humano (por ejemplo, un anticuerpo producido en un ratón que se ha modificado por ingeniería genética para producir un anticuerpo a partir de una secuencia de inmunoglobulina humana), un anticuerpo humanizado o un anticuerpo no humano, por ejemplo, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (por ejemplo, mono), conejo o camello. Los ejemplos de métodos para generar una versión humanizada de anticuerpos incluyen, entre otros, injerto de CDR (Queen *et al*, patente estadounidense n.º 5.585.089; Riechmann *et al*, Nature 332: 323 (1988)), intercambio de cadenas (patente estadounidense n.º 5.565.332); y renovación o remodelación de la superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596); Padlan, Molecular Immunology 28 (415): 489-498 (1991); Studnicka *et al*, Protein Engineering 7 (6): 805-814 (1994); Roguska *et al*, PNAS 91: 969-973 (1994)). Ejemplos de métodos para generar anticuerpos completamente humanos incluyen, entre otros, la generación de anticuerpos a partir de ratones que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana y el uso de la tecnología de presentación en fagos para generar y examinar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana.

Se pretende que un “anticuerpo aislado” se refiera a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CKB o SLC6a8 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de tal antígeno). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” tal como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una sola especificidad y afinidad de unión para un epítipo particular.

El término “anticuerpo humano”, tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que las regiones tanto marco como CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, sobre secuencias marco humanas.

El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que presentan una especificidad de unión única que tienen regiones variables en las que las regiones tanto marco como CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionada a una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo humano recombinante”, tal como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo (descrito más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinante, combinatoria y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas realizaciones, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de región constante de cadena pesada. Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de manera intercambiable en el presente documento con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno”. Tal como se usa en el presente documento, el término “alta afinidad” para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K<sub>D</sub> de 10<sup>-7</sup> M o menos, preferiblemente 10<sup>-8</sup> M o menos, más preferiblemente 10<sup>-9</sup> M o menos e incluso más preferiblemente 10<sup>-10</sup> M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de “alta afinidad” para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K<sub>D</sub> de 10<sup>-7</sup> M o menos, más preferiblemente 10<sup>-8</sup> M o menos.

En un ejemplo, una composición contiene un anticuerpo monoclonal que neutraliza CKB o SLC6a8. En una realización, este anticuerpo puede ser un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo no humano, por ejemplo, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (por ejemplo, mono), conejo o camello. En una realización, uno o más aminoácidos de este anticuerpo monoclonal pueden sustituirse con el fin de alterar sus propiedades físicas. Estas propiedades incluyen, pero no se limitan a, especificidad de unión, afinidad de unión, inmunogenicidad e isotipo de anticuerpo. Pueden usarse composiciones farmacéuticas que contienen versiones completamente humanas o humanizadas de los anticuerpos descritos anteriormente para tratar el cáncer de colon o para inhibir la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas.

Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" se refiere a un ser humano y un animal no humano. Los ejemplos de un animal no humano incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como mamíferos no humanos, primates no humanos (particularmente primates superiores), perros, roedores (por ejemplo, ratón o rata), cobaya, gato y conejo, y animales distintos de mamíferos, tales como aves, anfibios, reptiles, etc. En una realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un animal experimental o animal adecuado como modelo de enfermedad. Un sujeto que va a tratarse de un trastorno puede identificarse mediante técnicas de diagnóstico convencionales para el trastorno. Opcionalmente, puede examinarse al sujeto para determinar una mutación, el nivel de expresión o el nivel de actividad de uno o más de CKB, SLC6a8, miR-483-5p y miR-551a mencionados anteriormente mediante métodos conocidos en la técnica o descritos anteriormente antes del tratamiento. Si el sujeto tiene una mutación particular en el gen, o si la expresión génica o el nivel de actividad es, por ejemplo, mayor (en el caso de CKB o SLC6a8) en una muestra del sujeto que, en una muestra de una persona normal, el sujeto es candidato para el tratamiento de esta invención.

Para confirmar la inhibición o el tratamiento, puede evaluarse y/o verificarse la inhibición de la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas usando tecnología conocida en la técnica antes y/o después de la etapa de administración. Las tecnologías a modo de ejemplo incluyen exploraciones de CT o exploraciones de PET de órganos del cuerpo.

"Tratar" o "tratamiento" tal como se usa en el presente documento se refiere a la administración de un compuesto o agente a un sujeto que tiene un trastorno con el propósito de curar, aliviar, mitigar, remediar, retrasar el inicio de, prevenir o mejorar el trastorno, el síntoma de un trastorno, el estado patológico secundario al trastorno o la predisposición hacia el trastorno. Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto o agente que es capaz de producir un resultado médicamente deseable en un sujeto tratado. El método de tratamiento puede realizarse *in vivo* o *ex vivo* solo o conjuntamente con otros fármacos o terapia. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no se pretende que se limite a una formulación o vía de administración particular.

Puede administrarse un agente terapéutico *in vivo* o *ex vivo* solo o coadministrado conjuntamente con otros fármacos o terapia, es decir, una terapia de cóctel. Tal como se usa en el presente documento, el término "coadministración" o "coadministrado" se refiere a la administración de al menos dos agentes o terapias a un sujeto. Por ejemplo, en el tratamiento de tumores, particularmente tumores malignos, los agentes pueden usarse solos o en combinación con, por ejemplo, agentes quimioterápicos, radioterápicos, apoptóticos, antiangiogénicos y/o inmunotoxinas o coagulandos. En algunas realizaciones, la administración conjunta de dos o más agentes/terapias es concurrente. En otras realizaciones, se administra un primer agente/terapia antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en la técnica entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes/terapias utilizados pueden variar.

En un enfoque *in vivo*, un compuesto o agente se administra a un sujeto. Generalmente, el compuesto se suspende en un vehículo farmacéuticamente aceptable (tal como, por ejemplo, a solución salina fisiológica) y se administra por vía oral o por infusión intravenosa, o se inyecta o implanta por vía subcutánea, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal o intrapulmonar.

La dosificación requerida depende de la elección de la vía de administración; la naturaleza de la formulación; la naturaleza de la enfermedad del paciente; el tamaño, peso, área de superficie, edad y sexo del sujeto; otros fármacos administrados; y el criterio del médico encargado. Las dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,01-100 mg/kg. Cabe esperar variaciones en la dosificación necesaria en vista de la variedad de compuestos disponibles y las diferentes eficacias de diversas vías de administración. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral requiera dosificaciones más altas que la administración por inyección i.v. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas convencionales para la optimización, tal como se entiende bien en la técnica. La encapsulación del compuesto en un vehículo de administración adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficiencia de la administración, particularmente para la administración oral.

#### Composiciones

Dentro del alcance de esta invención está una composición que contiene un portador adecuado y uno o más de los

agentes terapéuticos descritos anteriormente. La composición puede ser una composición farmacéutica que contiene un portador farmacéuticamente aceptable, una composición dietética que contiene un portador adecuado dietéticamente aceptable o una composición cosmética que contiene un portador cosméticamente aceptable.

5 El término “composición farmacéutica” se refiere a la combinación de un agente activo con un portador, inerte o activo, haciendo que la composición sea especialmente adecuada para uso de diagnóstico o terapéutico *in vivo* o *ex vivo*. Un “portador farmacéuticamente aceptable”, después de administrarse a o sobre un sujeto, no provoca efectos fisiológicos indeseables. El portador en la composición farmacéutica debe ser “aceptable” también en el sentido de que es compatible con el principio activo y puede ser capaz de estabilizarlo. Pueden utilizarse uno o más agentes  
10 solubilizantes como portadores farmacéuticos para la administración de un compuesto activo. Los ejemplos de un portador farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, vehículos biocompatibles, adyuvantes, aditivos y diluyentes para lograr una composición utilizable como forma de dosificación. Los ejemplos de otros portadores incluyen óxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa, laurilsulfato de sodio y D&C Yellow n.º 10.

15 La composición descrita anteriormente, en cualquiera de las formas descritas anteriormente, puede usarse para tratar cáncer de colon. Una cantidad eficaz se refiere a la cantidad de un compuesto/agente activo que se requiere para conferir un efecto terapéutico en un sujeto tratado. Las dosis eficaces variarán, tal como reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de los tipos de enfermedades tratadas, la vía de administración, el uso de excipientes y la posibilidad de uso conjunto con otro tratamiento terapéutico.

20 Una composición farmacéutica de esta invención puede administrarse por vía parenteral, oral, nasal, rectal, tópica o bucal. El término “parenteral” tal como se usa en el presente documento se refiere a inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional o intracraneal, así como a cualquier técnica de infusión adecuada.

25 Una composición inyectable estéril puede ser una disolución o suspensión en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico. Tales disoluciones incluyen, pero no se limitan a, 1,3-butanodiol, manitol, agua, solución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos como disolvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono o diglicéridos sintéticos). El ácido graso, tal como ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, versiones polioxiethyladas de los mismos. Estas disoluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. Otros tensioactivos comúnmente usados, tales como Tweens o Spans u otros agentes emulsionantes similares o potenciadores de biodisponibilidad, que se usan  
30 comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables, también pueden usarse para fines de formulación.

35 Una composición para administración oral puede ser cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral incluyendo cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y disoluciones acuosas. En el caso de comprimidos, los portadores comúnmente usados incluyen, pero no se limitan a, lactosa y almidón de maíz. Agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, también se añaden normalmente. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos agentes  
40 edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

45 Las composiciones farmacéuticas para administración tópica según la invención descrita pueden formularse como disoluciones, pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, pastas, geles, aerosoles, aerosoles o aceites. Alternativamente, las formulaciones tópicas pueden estar en forma de parches o apósitos impregnados con principio(s) activo(s), que opcionalmente pueden comprender uno o más excipientes o diluyentes. En algunas realizaciones preferidas, las formulaciones tópicas incluyen un material que potenciaría la absorción o penetración del/de los agente(s) activo(s) a través de la piel u otras zonas afectadas.

50 Una composición tópica contiene una cantidad segura y eficaz de un portador dermatológicamente aceptable adecuado para su aplicación a la piel. Una composición o componente “cosméticamente aceptable” o “dermatológicamente aceptable” se refiere a una composición o componente que es adecuado para su uso en contacto con la piel humana sin excesiva toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares. El portador permite que un agente activo y un componente opcional se administren a la piel a una concentración o concentraciones apropiadas. Por tanto, el portador puede actuar como diluyente, dispersante, disolvente o similar  
55 para garantizar que los materiales activos se aplican a y se distribuyen uniformemente sobre el objetivo seleccionado a una concentración apropiada. El portador puede ser sólido, semisólido o líquido. El portador puede estar en forma de una loción, una crema o un gel, en particular uno que tiene un espesor o punto de fluencia suficiente para evitar que los materiales activos se sedimenten. El portador puede ser inerte o presentar beneficios dermatológicos. También debe ser física y químicamente compatible con los componentes activos descritos en el presente documento, y no debe alterar indebidamente la estabilidad, eficacia u otros beneficios de uso asociados con la composición.

Métodos de diagnóstico y pronóstico

Los genes descritos anteriormente pueden usarse para determinar si un sujeto tiene o corre el riesgo de tener cáncer de colon metastásico. Alternativamente, pueden usarse para determinar un pronóstico de tal trastorno en un sujeto.

*Métodos de diagnóstico*

La descripción proporciona información cualitativa y cuantitativa para determinar si un sujeto tiene o está predispuesto a cáncer de colon metastásico, predispuesto a la recaída del cáncer de colon metastásico, predispuesto a un cáncer de colon que es resistente a la quimioterapia u otra enfermedad caracterizada por supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas. Un sujeto que tiene dicho trastorno o es propenso al mismo puede determinarse basándose en los niveles de expresión, patrones o perfiles de los genes descritos anteriormente o sus productos (ARNm, microARN o polipéptidos) en una muestra de prueba del sujeto. En otras palabras, los productos pueden usarse como marcadores para indicar la presencia o ausencia del trastorno. Los ensayos de diagnóstico y pronóstico de la invención incluyen métodos para evaluar el nivel de expresión de los productos. Los métodos permiten detectar el trastorno. Por ejemplo, un aumento relativo en el nivel de expresión de uno o más promotores (es decir, CKB o SLC6a8) es indicativo de la presencia del trastorno. Por el contrario, un nivel de expresión menor o una falta de expresión es una falta indicativa del trastorno. De manera similar, un nivel de expresión menor o la falta de uno o más supresores (es decir, miR-483-5p o miR-551a) es indicativo de la presencia del trastorno, mientras que un aumento relativo en el nivel de expresión es la falta indicativa del trastorno.

La presencia, nivel o ausencia de un producto de ARNm, microARN o polipéptido en una muestra de prueba puede evaluarse obteniendo una muestra de prueba de un sujeto de prueba y poniendo en contacto la muestra de prueba con un compuesto o un agente capaz de detectar el ácido nucleico (por ejemplo, sonda de ARN o ADN) o polipéptido. La "muestra de prueba" incluye tejidos, células y líquidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. El nivel de expresión de un gen o genes de interés puede medirse de varias maneras, incluyendo la medición del ARN codificado por el gen.

Las muestras de ARN expresadas pueden aislarse de muestras biológicas usando cualquiera de varios procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, pueden lisarse muestras biológicas en un tampón de lisis basado en guanidinio, que contiene opcionalmente componentes adicionales para estabilizar el ARN. En algunas realizaciones, el tampón de lisis puede contener ARN purificados como controles para monitorizar la recuperación y la estabilidad del ARN a partir de los cultivos celulares. Los ejemplos de tales moldes de ARN purificado incluyen el ARN de control positivo de kanamicina de PROMEGA (Madison, WI) y el ARN de cola de poli(A) de 7,5 kb de LIFE TECHNOLOGIES (Rockville, MD). Los lisados pueden usarse inmediatamente o almacenarse congelados a, por ejemplo, -80°C.

Opcionalmente, el ARN total puede purificarse a partir de lisados celulares (u otros tipos de muestras) usando aislamiento basado en sílice en un formato de 96 pocillos compatible con automatización, tal como la plataforma de purificación RNEASY (QIAGEN, Inc., Valencia, CA). Se contemplan otros métodos de aislamiento de ARN, tal como extracción con perlas recubiertas de sílice o guanidinio. Un experto en la técnica puede idear métodos adicionales para el aislamiento y la preparación de ARN.

Los métodos de la presente descripción pueden realizarse usando muestras en bruto (por ejemplo, sangre, suero, plasma o lisados celulares), eliminando la necesidad de aislar el ARN. Se añaden opcionalmente inhibidores de ARNasa a las muestras en bruto. Cuando se usan lisados celulares en bruto, debe indicarse que el ADN genómico puede contribuir con una o más copias de una secuencia diana, por ejemplo, un gen, dependiendo de la muestra. En situaciones en las que la secuencia diana se deriva de uno o más genes altamente expresados, la señal que surge del ADN genómico puede no ser significativa. Pero para genes expresados a bajos niveles, el fondo puede eliminarse tratando las muestras con ADNasa o usando cebadores que se dirigen a las uniones de corte y empalme para el cebado posterior de ADNc o productos de amplificación.

El nivel de ARN correspondiente a un gen en una célula puede determinarse tanto *in situ* como *in vitro*. El ARN aislado a partir de una muestra de prueba puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen análisis de tipo Southern o Northern, análisis por PCR y alineaciones de sondas. Un método de diagnóstico preferido para la detección de niveles de ARN implica poner en contacto el ARN aislado con una sonda de ácido nucleico que puede hibridarse con el ARN codificado por el gen. La sonda puede ser un ácido nucleico de longitud completa o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 10 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas con el ARN.

En un formato, el ARN (o ADNc preparado a partir del mismo) se inmoviliza sobre una superficie y se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, ejecutando el ARN aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARN del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En otro formato, las sondas se inmovilizan sobre una superficie y el ARN (o ADNc) se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, en un alineamiento de chip génico. Un experto en

la técnica puede adaptar métodos de detección de ARN conocidos para detectar el nivel de ARN.

El nivel de ARN (o ADNc preparado a partir del mismo) en una muestra codificada por un gen que va a examinarse puede evaluarse con amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante PCR convencional (patente estadounidense n.º 4.683.202), RT-PCR (Bustin S. J Mol Endocrinol. 25: 169-93, 2000), PCR cuantitativa (Ong Y. *et al.*, Hematol. 7: 59-67 2002), PCR en tiempo real (Ginzinger D. Exp. Hematol. 30: 503-12 2002) y PCR *in situ* (Thaker V. Methods Mol Biol. 115: 379-402 1999), o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas conocidas en la técnica. En otra realización, los métodos de la descripción incluyen además poner en contacto una muestra de control con un compuesto o agente capaz de detectar el ARN de un gen y comparar la presencia del ARN en la muestra de control con la presencia del ARN en la muestra de prueba.

Los métodos y marcadores descritos anteriormente pueden usarse para evaluar el riesgo de un sujeto de desarrollar cáncer de colon. En particular, la descripción puede aplicarse a aquellos en una cohorte de alto riesgo que ya tienen ciertos riesgos para obtener una visión crítica de la detección temprana. Puede detectarse un cambio en los niveles de los productos génicos mencionados anteriormente asociados con el cáncer de colon antes de o en las primeras etapas del desarrollo de fenotipos transformados o neoplásicos en las células de un sujeto. Por tanto, la descripción también proporciona un método para examinar a un sujeto que corre el riesgo de desarrollar cáncer de colon o una recaída metastásica de su cáncer de colon, que comprende evaluar el nivel de al menos un producto genético, o una combinación de productos genéticos, asociados con el trastorno en una muestra biológica obtenida del sujeto. En consecuencia, una alteración en el nivel del producto genético, o combinación de productos génicos, en la muestra biológica en comparación con el nivel de un producto genético correspondiente en una muestra de control, es indicativa de que el sujeto corre el riesgo de desarrollar el trastorno. La muestra biológica usada para tal examen puede incluir una muestra de tejido que o bien es normal o bien se sospeche que es cancerosa. Los sujetos con un cambio en el nivel de uno o más productos genéticos asociados con cáncer de colon son candidatos para monitorización y pruebas adicionales. Tales pruebas adicionales pueden comprender el examen histológico de muestras de tejido u otras técnicas dentro de la experiencia en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "diagnóstico" significa detectar una enfermedad o trastorno o determinar el estadio o grado de una enfermedad o trastorno. Habitualmente, el diagnóstico de una enfermedad o trastorno se basa en la evaluación de uno o más factores y/o síntomas que son indicativos de la enfermedad. Es decir, puede hacerse un diagnóstico basándose en la presencia, ausencia o cantidad de un factor que es indicativo de la presencia o ausencia de la enfermedad o estado. No es necesario que cada factor o síntoma que se considera indicativo para el diagnóstico de una enfermedad en particular esté relacionado exclusivamente con la enfermedad particular; es decir, puede haber diagnósticos diferenciales que pueden inferirse de un síntoma o factor de diagnóstico. Asimismo, puede haber casos en los que un factor o síntoma que es indicativo de una enfermedad particular está presente en un individuo que no tiene la enfermedad particular. Los métodos de diagnóstico pueden usarse independientemente, o en combinación con otros métodos de diagnóstico y/o estadificación conocidos en la técnica médica para una enfermedad o trastorno particular, por ejemplo, cáncer de colon.

#### *Métodos de pronóstico*

Los métodos de diagnóstico descritos anteriormente pueden identificar sujetos que tienen o corren el riesgo de desarrollar cáncer de colon o la recaída del cáncer de colon metastásico. Además, los cambios en los niveles de expresión y/o tendencias de los genes mencionados anteriormente en una muestra biológica, por ejemplo, muestras de sangre periférica, pueden proporcionar una indicación temprana de recuperación o falta de la misma. Por ejemplo, un aumento adicional (o disminución) o niveles de expresión génica alterados persistentemente de los genes promotores (o genes inhibidores) indican un mal pronóstico, es decir, falta de mejora o deterioro de la salud (o también un mal pronóstico). En consecuencia, estos genes permiten evaluar la recuperación del cáncer de colon después del tratamiento. El análisis de este grupo selecto de genes o un subconjunto de los mismos indica los desenlaces de los estados.

Los ensayos de pronóstico descritos en el presente documento pueden usarse para determinar si un sujeto es adecuado para que se le administre un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro candidato a fármaco) para tratar el cáncer de colon u otros trastornos asociados con la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas. Por ejemplo, tales ensayos pueden usarse para determinar si a un sujeto puede administrársele un agente quimioterápico.

Por tanto, también se proporciona mediante esta descripción un método de monitorización de un tratamiento para un trastorno proliferativo celular en un sujeto. Para este propósito, los niveles de expresión génica de los genes dados a conocer en el presente documento pueden determinarse para muestras de prueba de un sujeto antes, durante o después de someterse a tratamiento. Luego se evalúan las magnitudes de los cambios en los niveles en comparación con un nivel de referencia. Una disminución en la expresión de los genes promotores mencionados anteriormente (por ejemplo, CKB o SLC6a8) después del tratamiento indica que el sujeto puede tratarse adicionalmente mediante el mismo tratamiento. De manera similar, un aumento en los inhibidores (por ejemplo, miR-

483-5p o miR-551a) también indica que el sujeto puede tratarse adicionalmente mediante el mismo tratamiento. Por el contrario, un aumento adicional o niveles de expresión altos persistentes de uno o más de los genes promotores (o una disminución adicional o niveles de expresión bajos persistentes o inexistentes de uno o más de los genes inhibidores) indica falta de mejora o deterioro de la salud.

5 La información obtenida de la puesta en práctica de los ensayos anteriores es útil en el pronóstico, la identificación de la progresión de y el manejo clínico de enfermedades y otros estados perjudiciales que afectan al estado de salud de un sujeto individual. En realizaciones preferidas, los ensayos de diagnóstico anteriores proporcionan información útil en el pronóstico, la identificación de la progresión de y el manejo del cáncer de colon, cáncer de colon  
10 metastásico y otros estados caracterizados por supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas. La información ayuda más específicamente al médico a diseñar regímenes de tratamiento quimioterapéutico u otros para erradicar tales estados del cuerpo de un sujeto afectado, un ser humano.

15 El término “pronóstico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una predicción del curso y desenlace probables de un estado o enfermedad clínica. El pronóstico se realiza generalmente evaluando los factores o síntomas de una enfermedad que son indicativos de un curso o desenlace favorable o desfavorable de la enfermedad. La frase “determinar el pronóstico” tal como se usa en el presente documento se refiere al proceso por el cual el experto en la técnica puede predecir el curso o desenlace de un estado en un paciente. El término  
20 “pronóstico” no se refiere a la capacidad de predecir el curso o desenlace de un estado con una precisión del 100%, en su lugar, el experto en la técnica entenderá que el término “pronóstico” se refiere a una mayor probabilidad de que produzca un cierto curso o desenlace; es decir, que un curso o desenlace es más probable que se produzca en un paciente que presenta un estado dado, en comparación con aquellos individuos que no presentan el estado.

25 Los términos “pronóstico favorable” y “pronóstico positivo” o “pronóstico desfavorable” y “pronóstico negativo” tal como se usan en el presente documento son términos relativos para la predicción del curso probable y/o desenlace probable de un estado o enfermedad. Un pronóstico favorable o positivo predice un mejor desenlace para un estado que un pronóstico desfavorable o negativo. En un sentido general, un “pronóstico favorable” es un desenlace que es relativamente mejor que muchos otros pronósticos posibles que podrían estar asociados con un estado particular,  
30 mientras que un pronóstico desfavorable predice un desenlace que es relativamente peor que muchos otros pronósticos posibles que podrían estar asociados con un estado particular. Los ejemplos típicos de un pronóstico favorable o positivo incluyen una tasa de curación mejor que el promedio, una menor propensión a metástasis, una esperanza de vida más larga de lo esperado, la diferenciación de un proceso benigno de un proceso canceroso, y similares. Por ejemplo, un pronóstico positivo es uno en el que un paciente tiene un 50% de probabilidad de curarse de un cáncer particular después del tratamiento, mientras que el paciente promedio con el mismo cáncer tiene solo un 25% de probabilidad de curarse.

Los términos “determinar”, “medir”, “evaluar” y “analizar” se usan de manera intercambiable e incluyen tanto la medición cuantitativa como la cualitativa, e incluyen determinar si una característica, rasgo o particularidad está  
40 presente o no. La evaluación puede ser relativa o absoluta. “Evaluar la presencia de una diana incluye determinar la cantidad de la diana presente, así como determinar si está presente o ausente.

#### *Alineaciones*

45 También se proporciona en la descripción un biochip o alineamiento. El biochip/alineamiento puede contener un sustrato sólido o semisólido que tiene una sonda unida o una pluralidad de sondas descritas en el presente documento. Las sondas pueden ser capaces de hibridarse con una secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas. Las sondas pueden unirse en una dirección definida espacialmente en el sustrato. Puede usarse más de una sonda por secuencia diana, con o bien sondas solapantes o bien sondas para diferentes secciones de una  
50 secuencia diana particular. Las sondas pueden ser capaces de hibridarse con secuencias diana asociadas con un solo trastorno apreciado por los expertos en la técnica. Las sondas pueden sintetizarse en primer lugar, con posterior unión al biochip, o pueden sintetizarse directamente sobre el biochip.

“Unido” o “inmovilizado” tal como se usa en el presente documento para referirse a un ácido nucleico (por ejemplo, una sonda) y un soporte sólido puede significar que la unión entre la sonda y el soporte sólido es suficiente como para ser estable en condiciones de unión, lavado, análisis y eliminación. La unión puede ser covalente o no covalente. Pueden formarse enlaces covalentes directamente entre la sonda y el soporte sólido o pueden formarse mediante un agente de reticulación o mediante la inclusión de un grupo reactivo específico en o bien el soporte  
55 sólido o bien la sonda o ambas moléculas. La unión no covalente puede ser una o más interacciones electrostáticas, hidrófilas e hidrófobas. En la unión no covalente se incluye la unión covalente de una molécula, tal como estreptavidina, al soporte y la unión no covalente de una sonda biotinilada a la estreptavidina. La inmovilización también puede implicar una combinación de interacciones covalentes y no covalentes.

65 El sustrato sólido puede ser un material que puede modificarse para contener sitios individuales diferenciados apropiados para la unión o asociación de las sondas y es susceptible de al menos un método de detección. Los ejemplos de tales sustratos incluyen vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo acrílicos,

poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales a base de sílice, incluyendo silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos y plásticos. Los sustratos pueden permitir la detección óptica sin fluorescencia apreciable.

El sustrato puede ser plano, aunque también pueden usarse otras configuraciones de sustratos. Por ejemplo, pueden colocarse sondas en la superficie interior de un tubo, para el análisis de la muestra por flujo continuo para minimizar el volumen de la muestra. De manera similar, el sustrato puede ser flexible, tal como espuma flexible, incluyendo espumas de célula cerrada hechas de plásticos particulares.

El alineamiento/biochip y la sonda pueden derivatizarse con grupos químicos funcionales para la posterior unión de los dos. Por ejemplo, el biochip puede derivatizarse con un grupo químico funcional incluyendo grupos amino, grupos carboxilo, grupos oxo o grupos tiol. Usando estos grupos funcionales, las sondas pueden unirse usando grupos funcionales en las sondas o bien directa o bien indirectamente usando un ligador. Las sondas pueden unirse al soporte sólido mediante o bien el extremo 5' terminal, el extremo 3' terminal o bien mediante un nucleótido interno. La sonda también puede unirse al soporte sólido de manera no covalente. Por ejemplo, pueden prepararse oligonucleótidos biotinilados, que pueden unirse a superficies recubiertas covalentemente con estreptavidina, dando como resultado la unión. Alternativamente, las sondas pueden sintetizarse en la superficie usando técnicas tales como fotopolimerización y fotolitografía. Puede encontrarse una discusión detallada de métodos para unir ácidos nucleicos a un sustrato de soporte en, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5837832, 6087112, 5215882, 5707807, 5807522, 5958342, 5994076, 6004755, 6048695, 6060240, 6090556 y 6040138.

En algunas realizaciones, un transcrito expresado (por ejemplo, un transcrito de un microARN o un gen de polipéptido descrito en el presente documento) está representado en los alineamientos de ácido nucleico. En tales realizaciones, un conjunto de sitios de unión puede incluir sondas con diferentes ácidos nucleicos que son complementarios a diferentes segmentos de secuencia del transcrito expresado. Los ejemplos de tales ácidos nucleicos pueden tener una longitud de 15 a 200 bases, 20 a 100 bases, 25 a 50 bases, 40 a 60 bases. Cada secuencia de sonda también puede incluir una o más secuencias de ligador además de la secuencia que es complementaria a su secuencia diana. Una secuencia de ligador es una secuencia entre la secuencia que es complementaria a su secuencia diana y la superficie de soporte. Por ejemplo, los alineamientos de ácido nucleico de la invención pueden tener una sonda específica para cada gen de microARN diana. Sin embargo, si se desea, los alineamientos de ácido nucleico pueden contener al menos 2, 5, 10, 100, 200, 300, 400, 500 o más sondas específicas para algún transcrito expresado (por ejemplo, un transcrito de un gen de microARN descrito en el presente documento).

#### *Kits*

La presente descripción proporciona kits que incorporan los métodos, composiciones y sistemas para el análisis de los polipéptidos y la expresión de microARN tal como se describe en el presente documento. Un kit de este tipo puede contener un ácido nucleico descrito en el presente documento junto con cualquiera o todos los siguientes: reactivos de ensayo, tampones, sondas y/o cebadores, y solución salina estéril u otra base de emulsión y suspensión farmacéuticamente aceptable. Además, el kit puede incluir materiales de instrucciones que contienen directrices (por ejemplo, protocolos) para la puesta en práctica de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el kit puede ser un kit para la amplificación, detección, identificación o cuantificación de una secuencia de ARNm o microARN diana. Para ese fin, el kit puede contener un cebador adecuado (por ejemplo, cebadores de horquilla), un cebador directo, un cebador inverso y una sonda.

En un ejemplo, un kit de la descripción incluye uno o más portaobjetos de microalineamientos (o formato de microalineamientos alternativo) sobre los cuales se han depositado una pluralidad de ácidos nucleicos diferentes (cada uno correspondiente a uno de los genes mencionados anteriormente). El kit también puede incluir una pluralidad de sondas marcadas. Alternativamente, el kit puede incluir una pluralidad de secuencias de polinucleótidos adecuadas como sondas y una selección de marcadores adecuados para personalizar las secuencias de polinucleótidos incluidas u otras secuencias de polinucleótidos a criterio del profesional. Comúnmente, al menos una secuencia de polinucleótido incluida corresponde a una secuencia de control, por ejemplo, un gen de normalización o similar. Los marcadores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un fluoróforo, un tinte, un radiomarcador, una etiqueta enzimática, que está unida a un cebador de ácido nucleico.

En una realización, se proporcionan kits que son adecuados para amplificar el ácido nucleico correspondiente a las muestras de ARN expresadas. Un kit de este tipo incluye reactivos y cebadores adecuados para su uso en cualquiera de los métodos de amplificación descritos anteriormente. Alternativamente, o adicionalmente, los kits son adecuados para amplificar una señal correspondiente a la hibridación entre una sonda y una muestra de ácido nucleico diana (por ejemplo, depositada en un microalineamiento).

Además, uno o más materiales y/o reactivos requeridos para preparar una muestra biológica para el análisis de expresión génica se incluyen opcionalmente en el kit. Además, opcionalmente se incluyen en los kits una o más enzimas adecuadas para amplificar ácidos nucleicos, incluyendo diversas polimerasas (RT, Taq, etc.), uno o más

desoxinucleótidos y tampones para proporcionar la mezcla de reacción necesaria para la amplificación.

5 Normalmente, los kits se emplean para analizar patrones de expresión génica usando ARNm o microARN como molde de partida. El molde de ARN puede presentarse como o bien ARN celular total o bien ARN aislado; ambos tipos de muestra producen resultados comparables. En otras realizaciones, los métodos y kits descritos en la presente descripción permiten la cuantificación de otros productos de expresión génica, incluyendo ARNt, ARNr u otros productos de transcripción.

10 Opcionalmente, los kits de la descripción incluyen además software para acelerar la generación, el análisis y/o el almacenamiento de datos, y para facilitar el acceso a bases de datos. El software incluye instrucciones lógicas, conjuntos de instrucciones o programas informáticos adecuados que pueden usarse en la recogida, el almacenamiento y/o el análisis de los datos. El análisis comparativo y relacional de los datos es posible usando el software proporcionado.

15 Los kits contienen opcionalmente recipientes distintos para cada componente de reactivo y/o enzima individual. Cada componente generalmente será adecuado tal como está alicuotado en su recipiente respectivo. El recipiente de los kits incluye opcionalmente al menos un vial, ampolla o tubo de ensayo. También son posibles frascos, botellas y otros mecanismos de recipiente en los que los reactivos pueden colocarse y/o alicuotarse. Los recipientes individuales del kit se mantienen preferiblemente en confinamiento cerrado para la venta comercial. Los recipientes más grandes adecuados pueden incluir recipientes de plástico moldeados por soplado o inyección en los que se retienen los viales deseados. Se proporcionan opcionalmente con el kit instrucciones, tales como instrucciones escritas o demostraciones grabadas en video que detallan el uso de los kits de la presente invención.

25 La presente descripción proporciona el uso de cualquier composición o kit en el presente documento, para la puesta en práctica de cualquier método o ensayo en el presente documento, y/o el uso de cualquier aparato o kit para poner en práctica cualquier ensayo o método en el presente documento.

30 Una "muestra de prueba" o una "muestra biológica" tal como se usa en el presente documento puede significar una muestra de fluido o tejido biológico que comprende ácidos nucleicos. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a, tejido o fluido corporal aislado de animales. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos, tales como biopsias y muestras de autopsias, secciones congeladas tomadas con fines histológicos, sangre, plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, moco, orina, derrames, líquido amniótico, líquido ascítico, cabello y piel. Las muestras biológicas también incluyen explantes y cultivos celulares primarios y/o transformados derivados de tejidos de pacientes. Puede proporcionarse una muestra biológica retirando una muestra de células de un animal, pero también puede lograrse mediante el uso de células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento y/o para otro propósito), o realizando los métodos descritos en el presente documento *in vivo*. También pueden usarse tejidos de archivo, como los que tienen historial de tratamiento o desenlace.

40 El término "fluido corporal" o "líquido corporal" se refiere a cualquier fluido del cuerpo de un animal. Los ejemplos de fluidos corporales incluyen, pero no se limitan a, plasma, suero, sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina, saliva, mucosa, flemas y esputos. Puede recogerse una muestra de fluido corporal por cualquier método adecuado. La muestra de fluido corporal puede usarse inmediatamente o puede almacenarse para su uso posterior. Puede usarse cualquier método de almacenamiento adecuado conocido en la técnica para almacenar la muestra de fluido corporal: por ejemplo, la muestra puede congelarse a de aproximadamente -20°C a aproximadamente -70°C. Fluidos corporales adecuados son fluidos acelulares. Los fluidos "acelulares" incluyen muestras de fluidos corporales en las que las células están ausentes o están presentes en cantidades tan bajas que el nivel de miARN determinado refleja su nivel en la porción líquida de la muestra, en lugar de en la porción celular. Tales fluidos corporales acelulares generalmente se producen procesando un fluido corporal que contiene células mediante, por ejemplo, centrifugación o filtración, para eliminar las células. Normalmente, un fluido corporal acelular no contiene células intactas, sin embargo, algunas pueden contener fragmentos celulares o restos celulares. Los ejemplos de fluidos acelulares incluyen plasma o suero, o fluidos corporales de los cuales se eliminaron las células.

55 El término "gen" usado en el presente documento se refiere a un gen natural (por ejemplo, genómico) o sintético que comprende secuencias reguladoras transcripcionales y/o traduccionales y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones, secuencias no traducidas en 5' y 3'). La región codificante de un gen puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos o un ARN funcional, tal como ARNt, ARNr, ARN catalítico, ARNic, miARN o ARN antisentido. Un gen también puede ser un ARNm o ADNc correspondiente a las regiones codificantes (por ejemplo, exones y miARN) que comprende opcionalmente secuencias no traducidas en 5' o 3' unidas a las mismas. Un gen también puede ser una molécula de ácido nucleico amplificada producida *in vitro* que comprende toda o parte de la región codificante y/o secuencias no traducidas en 60 5' o 3' unidas a la misma. El término también incluye pseudogenes, que son parientes disfuncionales de genes conocidos que han perdido su capacidad de codificación de proteínas o que ya no se expresan por lo demás en una célula.

65 "Perfil de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a un perfil de expresión genómica, por ejemplo, un perfil de expresión de microARN. Los perfiles pueden generarse por cualquier medio conveniente para

determinar el nivel de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, hibridación cuantitativa de microARN, ARNc, etc., PCR cuantitativa, ELISA para cuantificación y similares, y permitir el análisis de la expresión génica diferencial entre dos muestras. Se somete a ensayo una muestra de sujeto o paciente, por ejemplo, células o una colección de las mismas, por ejemplo, tejidos. Las muestras se recogen por cualquier método conveniente, tal como se conoce en la técnica. Las secuencias de ácido nucleico de interés son secuencias de ácido nucleico que se encuentra que son predictivas, incluyendo las secuencias de ácido nucleico de las descritas en el presente documento, donde el perfil de expresión puede incluir datos de expresión para 5, 10, 20, 25, 50, 100 o más de, incluyendo todas las secuencias de ácido nucleico enumeradas. El término "perfil de expresión" también puede significar medir la abundancia de las secuencias de ácido nucleico en las muestras medidas.

"Expresión diferencial" se refiere a diferencias cualitativas o cuantitativas en los patrones de expresión génica temporal y/o celular dentro y entre células y tejidos. Por tanto, un gen expresado de manera diferencial puede tener su expresión cualitativamente alterada, incluyendo una activación o inactivación en, por ejemplo, tejido normal frente a enfermo. Los genes pueden activarse o desactivarse en un estado particular, en relación con otro estado, permitiendo así la comparación de dos o más estados. Un gen regulado cualitativamente presentará un patrón de expresión dentro de un estado o tipo de célula que puede ser detectable por técnicas convencionales. Algunos genes se expresarán en un estado o tipo celular, pero no en ambos. Alternativamente, la diferencia en la expresión puede ser cuantitativa, por ejemplo, porque la expresión está modulada, regulada por incremento, dando como resultado una cantidad aumentada de transcrito, o regulada por disminución, dando como resultado una cantidad disminuida de transcrito. El grado en que la expresión difiere solo debe ser lo suficientemente grande como para cuantificarlo por medio de técnicas de caracterización convencionales, tales como alineamientos de expresión, PCR de transcriptasa inversa cuantitativa, análisis de tipo Northern y protección contra ARNasas.

"Ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido" tal como se usa en el presente documento se refiere a al menos a dos nucleótidos unidos covalentemente. La representación de una sola hebra también define la secuencia de la hebra complementaria. Por tanto, un ácido nucleico también abarca la hebra complementaria de una sola hebra representada. Pueden usar muchas variantes de un ácido nucleico para el mismo propósito que un ácido nucleico dado. Por tanto, un ácido nucleico también abarca ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de los mismos. Una sola hebra proporciona una sonda que puede hibridarse con una secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas. Por tanto, un ácido nucleico también abarca una sonda que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener porciones de secuencias tanto bicatenarias como monocatenarias. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribosa y ribonucleótidos, y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes.

El término "cebador" se refiere a cualquier ácido nucleico que es capaz de hibridarse en su extremo 3' con una molécula de ácido nucleico complementario, y que proporciona un extremo terminal hidroxilo 3' libre que puede extenderse por un ácido nucleico polimerasa. Tal como se usa en el presente documento, los cebadores de amplificación son un par de moléculas de ácido nucleico que pueden aparearse con las regiones 5' o 3' de un gen (cadenas positiva y negativa, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre medias. En condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores. Para métodos *in situ*, puede prepararse una muestra de células o tejidos e inmovilizarse sobre un soporte, tal como un portaobjetos de vidrio, y luego ponerse en contacto con una sonda que puede hibridarse con el ARN. Los métodos alternativos para amplificar ácidos nucleicos correspondientes a muestras de ARN expresado incluyen los descritos en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.897.750.

El término "sonda", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente a través de apareamiento de bases complementarias, habitualmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Puede haber cualquier número de apareamientos erróneos de pares de bases que interferirán con la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios descritos en el presente documento. Sin embargo, si el número de mutaciones es tan grande que no puede producirse hibridación incluso en las condiciones de hibridación menos rigurosas, la secuencia no es una secuencia diana complementaria. Una sonda puede ser monocatenaria o parcialmente mono y parcialmente bicatenaria. La configuración de cadenas de la sonda está dictada por la estructura, composición y propiedades de la secuencia diana. Las sondas pueden marcar directa o indirectamente, tal como con biotina a la que puede unirse posteriormente un complejo de estreptavidina.

"Complemento" o "complementario" tal como se usa en el presente documento para referirse a un ácido nucleico puede significar apareamiento de bases de Watson-Crick (por ejemplo, A-T/U y C-G) o de Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico. Un complemento completo o completamente

complementario puede significar un apareamiento de bases el 100% complementario entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico.

5 “Condiciones de hibridación rigurosas”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones en las que una primera secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, sonda) se hibrida con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, diana), tal como en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y pueden ser diferentes en diferentes circunstancias, y un experto en la técnica puede seleccionarlas adecuadamente. Pueden seleccionarse condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5-10°C inferiores al punto de fusión térmica (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T<sub>m</sub> puede ser la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidas) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a T<sub>m</sub>, el 50%) de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas pueden ser aquellas en las que la concentración de sal es menor de aproximadamente 1,0 M de iones de sodio, tal como aproximadamente 0,01-1,0 M de concentración de iones de sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, aproximadamente 10-50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayores de aproximadamente 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser de al menos 2 a 10 veces hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas a modo de ejemplo incluyen las siguientes: el 50% de formamida, 5xSSC y el 1% de SDS, incubando a 42°C, o 5xSSC, el 1% de SDS, incubando a 65°C, con lavado en 0,2xSSC y el 0,1% de SDS a 65°C. Sin embargo, varios factores distintos de la temperatura, tal como la concentración de sal, pueden influir en la rigurosidad de la hibridación y un experto en la técnica puede seleccionar adecuadamente los factores para lograr una rigurosidad similar.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “valor de referencia” se refiere a un valor que se correlaciona estadísticamente con un desenlace particular en comparación con el resultado de un ensayo. En realizaciones preferidas, el valor de referencia se determina a partir del análisis estadístico de estudios que comparan la expresión de microARN o proteína con desenlaces clínicos conocidos. El valor de referencia puede ser un valor de puntuación umbral o un valor de puntuación de corte. Normalmente, un valor de referencia será un umbral por encima (o por debajo) de cual un desenlace es más probable y por debajo del cual un umbral alternativo es más probable.

35 En una realización, un nivel de referencia puede ser uno o más niveles de miARN o polipéptido expresados como un promedio del nivel del miARN o polipéptido de muestras tomadas de una población de control de sujetos sanos (libres de enfermedad). En otra realización, el nivel de referencia puede ser el nivel en el mismo sujeto en un momento diferente, por ejemplo, antes del presente ensayo, tal como el nivel determinado antes de que el sujeto desarrolle la enfermedad o antes de iniciar la terapia. En general, las muestras se normalizan por un factor común. Por ejemplo, las muestras de líquido corporal acelular se normalizan por volumen de líquido corporal y las muestras que contienen células se normalizan por contenido de proteínas o recuento celular. Las muestras de ácido nucleico también pueden normalizarse en relación con un ácido nucleico de control interno.

40 Tal como se da a conocer en el presente documento, la diferencia del nivel de uno o más polipéptidos o ARN (ARNm o microARN) es indicativa de una enfermedad o un estadio de la misma. La frase “diferencia del nivel” se refiere a las diferencias en la cantidad de un marcador particular, tal como un ácido nucleico, en una muestra en comparación con un control o nivel de referencia. Por ejemplo, la cantidad de un biomarcador particular puede estar presente en una cantidad elevada o en una cantidad disminuida en muestras de pacientes con una enfermedad neoplásica en comparación con un nivel de referencia. En una realización, una “diferencia de un nivel” puede ser una diferencia entre la cantidad de un biomarcador particular presente en una muestra en comparación con un control (por ejemplo, valor de referencia) de al menos aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 100%, 150%, 200%) o más. En una realización, una “diferencia de un nivel” puede ser una diferencia estadísticamente significativa entre las cantidades de un biomarcador presente en una muestra en comparación con un control. Por ejemplo, una diferencia puede ser estadísticamente significativa si el nivel medido del biomarcador se encuentra fuera de aproximadamente 1,0 desviaciones estándar, aproximadamente 1,5 desviaciones estándar, aproximadamente 2,0 desviaciones estándar o aproximadamente 2,5 desviaciones de la media de cualquier control o grupo de referencia. Con respecto a la medición de miARN, el nivel puede medirse a partir de PCR en tiempo real como el valor de Ct, que puede normalizarse a un valor de ΔCt tal como se describe en los ejemplos a continuación.

#### *Examen de fármacos*

60 La descripción proporciona a método para identificar un compuesto que es útil para tratar cáncer de colon o para inhibir la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas.

65 Pueden obtenerse compuestos candidatos que van a examinarse (por ejemplo, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, anticuerpos, moléculas pequeñas u otros fármacos) usando cualquiera de los numerosos enfoques de métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica. Tales bibliotecas incluyen:

bibliotecas de péptidos, bibliotecas de peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de péptidos, pero con una estructura principal novedosa, no peptídica que es resistente a la degradación enzimática); bibliotecas en fase de disolución o fase sólida en paralelo accesibles espacialmente; bibliotecas sintéticas obtenidas mediante selección por cromatografía de afinidad o deconvolución; y las bibliotecas de “una perla un compuesto”. Véanse, por ejemplo, Zuckermann *et al.* 1994, J. Med. Chem. 37:2678-2685; y Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145. Pueden encontrarse ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en, por ejemplo, DeWitt *et al.*, 1993, PNAS USA 90:6909; Erb *et al.*, 1994, PNAS USA 91: 11422; Zuckermann *et al.*, 1994, J. Med. Chem. 37:2678; Cho *et al.*, 1993, Science 261: 1303; Carrell *et al.*, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carrell *et al.*, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; y Gallop *et al.*, 1994 J. Med. Chem. 37: 1233. Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (por ejemplo, Houghten, 1992, Biotechniques 13:412-421), o sobre perlas (Lam, 1991, Nature 354:82-84), chips (Fodor, 1993, Nature 364:555-556), bacterias (patente estadounidense n.º 5.223.409), esporas (patente estadounidense n.º 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, 1992, PNAS USA 89: 1865-1869) o fagos (Scott y Smith 1990, Science 249:386-390; Devlin, 1990, Science 249:404-406; Cwirla *et al.*, 1990, PNAS USA 87:6378-6382; Felici 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310; y patente estadounidense n.º 5.223.409).

Para identificar un compuesto útil, puede ponerse en contacto un compuesto de prueba con un sistema que contiene células de prueba que expresan un gen indicador codificado por un ácido nucleico operativamente unido a un promotor de un gen marcador seleccionado de los supresores o promotores de metástasis mencionados anteriormente. El sistema puede ser un modelo de línea celular *in vitro* o un modelo animal *in vivo*. Las células pueden expresar de manera natural el gen, o pueden modificarse para expresar un ácido nucleico recombinante. El ácido nucleico recombinante puede contener un ácido nucleico que codifica para un polipéptido indicador para un promotor heterólogo. Entonces se mide el nivel de expresión del miARN, polipéptido o polipéptido indicador.

Para el polipéptido, el nivel de expresión puede determinarse o bien al nivel de ARNm o bien al nivel de proteína. En la técnica se conocen bien métodos de medición de los niveles de ARNm en una célula, una muestra de tejido o un líquido corporal. Para medir los niveles de ARNm, pueden lisarse las células y los niveles de ARNm en los lisados o en ARN purificado o semipurificado de los lisados puede determinarse, por ejemplo, mediante ensayos de hibridación (usando sondas de ARN o ADN específicas de gen marcadas de manera detectable) y RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa (usando cebadores específicos de gen apropiados). Alternativamente, pueden llevarse a cabo ensayos de hibridación *in situ* cuantitativos o semicuantitativos usando secciones de tejido o suspensiones de células sin lisar, y sondas de ARN o ADN marcadas de manera detectable (por ejemplo, fluorescente o enzimáticamente). Los métodos de cuantificación de ARNm adicionales incluyen ensayo de protección de ARN (RPA) y SAGE. También se conocen en la técnica métodos de medición de los niveles de proteína en una célula o una muestra de tejido.

Para determinar la eficacia de un compuesto candidato para tratar cáncer de colon o inhibir la supervivencia, supervivencia hipóxica, supervivencia metastásica o colonización metastásica de células cancerosas, puede compararse el nivel obtenido de la manera descrita anteriormente con un nivel de control (por ejemplo, uno obtenido en ausencia del compuesto candidato). El compuesto se identifica como eficaz si (i) el nivel de un supresor de metástasis es mayor que un nivel de control o referencia o (ii) el nivel de un promotor de metástasis es menor que el valor de control o referencia. Puede verificarse además la eficacia de un compuesto así identificado usando el modelo de cultivo celular *in vitro* o un modelo animal *in vivo* tal como se da a conocer en el ejemplo a continuación.

#### EJEMPLO 1

Este ejemplo describe materiales y métodos usados en los EJEMPLOS 2-15 a continuación.

##### *Selección in vivo*

Se suspendieron  $1 \times 10^6$  células LS174T que expresan un indicador de luciferasa en un volumen de 20  $\mu$ l de mezcla 1:1 de PBS/Matrigel y se inyectaron por vía intrahepática en los hígados de ratones NOD-SCID. Se permitió que se desarrollaran nódulos metastásicos a lo largo de un periodo de 3-4 semanas y se monitorizaron mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia. Se extirparon los nódulos formados y se disociaron mediante digestión con colagenasa y hialuronidasa para dar una suspensión de células individuales. Se permitió que las células se expandieran *in vitro* antes de su reinyección en los ratones. Tras tres reiteraciones de la selección *in vivo*, se establecieron líneas celulares derivadas de LvM3a y LvM3b altamente metastásicas.

##### *Examen de biblioteca de lenti-miR*

Se transdujeron las células con una biblioteca de lenti-miR de lentivirus de 611 miARN (System Biosciences) a una baja multiplicidad de infección (MOI) de manera que cada célula sobreexpresaba un solo miARN. Entonces se inyectó la población transducida por vía intrahepática en ratones NOD-SCID para la selección *in vivo* de miARN que, cuando se sobreexpresaban, o bien promovían o bien suprimían la colonización metastásica del hígado. Se realizaron amplificación por PCR de ADN genómico y recuperación de injertos de miARN lentiviral en las células antes de la inyección y a partir de nódulos de hígado según el protocolo del fabricante. La obtención del perfil de alineamientos de miARN permitió la cuantificación de insertos de miARN antes y después de la selección *in vivo*.

*Sistema de cultivo de cortes organotípicos*

5 Las células que iban a inyectarse se marcaron con rastreador de células rojo o verde (Invitrogen) y se inocularon en los hígados de ratones NOD-SCID a través de inyección intraesplénica. Entonces se extrajeron los hígados y se cortaron en cortes de 150  $\mu$ m usando un cortador de tejido McIlwain (Ted Pella) y se sembraron en placa sobre insertos de cultivo tisular organotípico (Millipore) y se cultivaron en medio E de William complementado con paquete de suplemento de mantenimiento de hepatocitos (Invitrogen). Tras los periodos de tiempo indicados, se fijaron los cortes de hígado en paraformaldehído y se obtuvieron imágenes de los mismos usando microscopia multifotónica.

10 *Ensayo de activación de caspasas in vivo*

15 Para medir la actividad caspasa *in vivo*, se usó el sustrato VivoGlo Caspase 3/7 (sal de sodio de Z-DEVD-aminoluciferina, Promega). La luciferina es inactiva hasta que el péptido DEVD se escinde de la misma mediante caspasa-3 activada en células apoptóticas. Se inyectó DEVD-luciferina en ratones que llevaban células de cáncer colorrectal que expresan luciferasa. Tras la activación por células apoptóticas, puede realizarse la obtención de imágenes de bioluminiscencia para medir la actividad caspasa *in vivo*. Cinco horas después de la medición de la actividad caspasa *in vivo*, se les inyecta a los ratones luciferina regular para fines de normalización.

20 *Terapia con virus adenoasociados*

25 Se clonaron miR-483-5p y miR-551a como un policistrón que consiste en ambos precursores de miARN con secuencias genómicas flanqueantes en tándem en el sitio BglII y NotI de scAAV.GFP (plásmido 21893, Addgene). A continuación, se enumeran secuencias genómicas que codifican para miR-483-5p y miR-551a (SEQ ID NO: 5 y 6), secuencias de precursor correspondientes (subrayadas, SEQ ID NO: 3 y 4) y secuencias de microARN maduras correspondientes (subrayadas y en negrita, SEQ ID NO: 1 y 2). Se empaquetaron los virus adenoasociados, se purificaron y se titularon usando el sistema de expresión VAA-DJ Helper Free de Cell Biolabs.

30 miR-551a:

GGAGAACCTTCAGCTTCATGTGACCCAGAGACTCCTGTATGCCTGGCTCTGGGAGTACAGAAGGGC  
 CTAGAGCTGACCCCTGCCCTCCGAAGCCCCTGGGGCACTAGATGGATGTGTGCCAGAGGGTAGTAG  
 AGGCCTGGGGGTAGAGCCCAGCACCCCTTCGCGTAGAGACCTGGGGGACCAGCCAGCCAGCAAC  
 CCCCTCGCGGCCGACGCCTGAGGCTGTTCTGGCTGCTCCGGTGGCTGCCAGAGGGGACTGCCGGG  
 TGACCCTGGAAATCCAGAGTGGGTGGGGCCAGTCTGACCGTTTCTAGGC**GACCCACTCTTGTTTC**  
**CAGGGTTGCCCTGGAAACCACAGATGGGGAGGGGTTGATGGCACCCAGCCTCCCCAAGCCTGGGA**  
 AGGGACCCCGGATCCCCAGAGCCTTCCCTGCCTATGGAGCGTTTCTCTTGAGAACAGGGGGGCC  
 TCTCAGCCCCCTCAATGCAAGTTGCTGAG

miR-483-5p:

CCTGCCCCATTTGGGGGTAGGAAGTGGCACTGCAGGGCCTGGTGCCAGCCAGTCCCTTGCCCAGGGA  
 GAAGCTTCCCTGCACCAGGCTTTCTGAGAGGAGGGGAGGGCCAAGCCCCACTTGGGGGACCCCC  
 GTGATGGGGCTCCTGCTCCCTCCTCCGGCTGATGGCACCTGCCCTTTGGCACCCCAAGGTGGAGCC  
 CCCAGCGACCTTCCCCTTCCAGCTGAGCATTGCTGTGGGGGAGAGGGG**GAAGACGGGAGGAAAGAA**  
**GGGAGTGGTTCCATCACGCCTCCTCACTCCTCCTCCCGTCTTCTCCTCCTCCTGCCCTTGCTCC**  
 CTGTCTCAGCAGCTCCAGGGGTGGTGTGGGCCCTCCAGCCTCCTAGGTGGTGCCAGGCCAGAGTC  
 CAAGCTCAGGGACAGCAGTCCCTCCTGTGGGGGCCCTGAACTGGGCTCACATCCCACACATTTTC  
 CAAACCACTCCCATTTGTGAGCCTTGGTCTGTGGTGTCCCTCTGGTGTGGGACCAAGAGCTTG  
 TGCCCATTTTTTCATCTGAGGAAGGAGGCAGC

A continuación, se enumeran las secuencias de ARN correspondientes para SEQ ID NO: 1-4 (SEQ ID NO: 7-10)

40 GACCCACUCUJUGGUUCCA (SEQ ID NO: 7)

GGGGACUGCCGGGUGACCCUGGAAUCCAGAGUGGGUGGGCCAGUCUGACCGUUUCUAGGCGACC  
 CACUCUUGGUUCCAGGGUUGCCUGGAAA (SEQ ID NO: 8)

GAAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG (SEQ ID NO: 9)

GAGGGGAAGACGGGAGGAAAGAAGGGAGUGGUUCCAUCACGCCUCCUCACUCCUCUCCUCCGUC  
 UUCUCCUCUC (SEQ ID NO: 10)

*Inactivación de CKB, SLC6a8*

Se pidieron a Sigma-Aldrich vectores de pLKO que expresaban horquillas de ARNhc que seleccionaban como diana CKB y SLC6a8. Se usaron dos horquillas independientes que proporcionaron la mejor inactivación de los niveles de transcrito para todos los experimentos. Estas secuencias de ADN y ARN en horquilla se enumeran a continuación:

Nombre	Secuencias de ADN	SEQ ID NO	Secuencias de ARN	SEQ ID NO
CKB	CCGGCCCAGATTGAAACTCTC TTCACCTCGAGTGAAGAGAGT TTCAATCTGGGTTTTT	11	CCGGCCCAGAUUGAAACUCUC UUCACUCGAGUGAAGAGAGUU UCAAUCUGGGUUUUU	15
CKB	CCGGCCGCGGTATCTGGCACA ATGACTCGAGTCATTGTGCCA GATACCGCGGTTTTTTG	12	CCGGCCGCGGUAUCUGGCACA AUGACUCGAGUCAUUGUGCCA GAUACCGCGGUUUUUUG	16
shSLC6a8 n.º 2	CCGGGCTGGTCTACAACAACA CTACTCGAGTAGGTGTTGTT GTAGACCAGCTTTTTG	19	CCGGGUCUGGUCUACAACAACACC UACUCGAGUAGGUGUUGUAG ACCAGCUUUUUG	20
shSLC6a8 n.º 4	CCGGCTTATTCCCTACGTCCT GATCCTCGAGGATCAGGACGT AGGGAATAAGTTTTTG	13	CCGGCUUAUCCCUACGUCCU GAUCCUCGAGGAUCAGGACGU AGGGAUAAGUUUUUG	17
shSLC6a8 n.º 5	CCGGATTACCTGGTCAAGTCC TTTACTCGAGTAAAGGACTTG ACCAGGTAATTTTTTG	14	CCGGAAUACUGGUCAAGUCC UUUACUCGAGUAAAGGACUUG ACCAGGUAUUUUUUUG	18

Se usaron los siguientes cebadores para qRT-PCR cuantitativa de SLC6a8: Cebador directo: 5'-GGC AGC TAC AAC CGC TTC AAC A-3' y cebador inverso: 5'-CAG GAT GGA GAA GAC CAC GAA G-3' (SEQ ID No. 21 y 22, respectivamente).

#### Tratamiento con ciclocreatina y ácido beta-guanidinopropiónico

Se trataron ratones con 10 mg de ciclocreatina o portador de solución salina, administrados a través de inyección intraperitoneal. El régimen de tratamiento comenzó un día después de la inoculación de células tumorales y continuó hasta que se sacrificaron los ratones. Se administró ácido beta-guanidinopropiónico a una dosis de 200 ul de disolución 0,5 M a través de inyección intraperitoneal. El régimen de tratamiento fue como el del tratamiento con ciclocreatina.

#### EJEMPLO 2

Como primera etapa para identificar reguladores moleculares de la colonización del hígado por cáncer de colon, se realizó una selección *in vivo* en la línea de cáncer de colon humano LS-174T para detectar colonización del hígado potenciada a través de inyección intrahepática iterativa de células cancerosas en ratones inmunodeficientes seguido por resección quirúrgica de las colonias del hígado y disociación de células. Más específicamente, se examinó la colonización del hígado por  $5 \times 10^5$  células LS-originales, LvM3a y LvM3b tras la inyección intrahepática directa mediante bioluminiscencia. Se obtuvieron imágenes de los ratones el día 21 tras la inyección y se extrajeron los hígados para la obtención de imágenes *ex vivo* y examen morfológico macroscópico. Se obtuvieron las razones de flujo de fotones para los grupos y se compararon. Se encontró que los colonizadores del hígado de tercera generación LS-LvM3a y LS-LvM3b presentaban una capacidad drásticamente potenciada (>50 veces) de colonización del hígado tras la inyección intrahepática en relación con su línea original. De manera importante, estos derivados también presentaban una capacidad metastásica del hígado significativamente potenciada (>150 veces) tras la inyección en la circulación portal en ensayos de colonización metastásica, revelando que la capacidad de colonización del hígado es una etapa clave en la progresión metastásica del cáncer de colon. Para estos ensayos de bioluminiscencia, todos los valores de P para las razones de flujo de fotones respectivas de los grupos se basaron en pruebas de la t de Student unilaterales y se encontró que eran menores de 0,05, 0,001 o 0,0001.

Con el fin de identificar sistemáticamente reguladores de microARN de la progresión metastásica, se transdujo una biblioteca de partículas lentivirales, que codifican cada una uno de los 611 microARN humanos, en la población de colonizadores LS-LvM3b, la línea original LS-174T, así como la población de cáncer de colon SW620. Estas poblaciones de cáncer, que contienen células cancerosas que expresan cada uno de los 661 miARN, se inyectaron entonces por vía intrahepática en ratones con el fin de permitir la selección de células capaces de colonizar el hígado. La amplificación por PCR genómica de secuencias de miARN, transcripción inversa y obtención del perfil de miARN de insertos de miARN permitió la cuantificación de la representación de insertos de miARN. Se identificó que varios miARN presentaban reducción en el contexto de la colonización del hígado en ambas líneas celulares de cáncer de colon, consecuente con la sobreexpresión de estos miARN que suprimen la colonización del hígado por células de cáncer de colon.

#### EJEMPLO 3

En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para examinar si los niveles endógenos de cualquiera de estos miARN presentan silenciamiento en derivados altamente metastásicos en relación con células isogénicas escasamente

metastásicas. De hecho, se encontró que miR-483-5p y miR-551a estaban silenciados en los colonizadores del hígado LS-LVM3a y LS-LVM3b altamente metastásicos en relación con su línea original y el derivado de SW620 metastásico en relación con su línea original isogénica. Consecuente con un papel supresor de estos miARN en la colonización del hígado, la sobreexpresión de miR-483-5p o miR-551a suprimió robustamente la colonización metastásica por las células LS-LvM3b, mientras que la inhibición de miR-483-5p o miR-551a endógenos en las líneas originales escasamente metastásicas LS-174T y SW480 potenció significativamente la colonización metastásica del hígado.

#### EJEMPLO 4

En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para investigar el/los mecanismo(s) mediante el cual/los cuales estos miARN ejercen sus efectos anti-metastásicos. Los efectos de estos miARN sobre la progresión metastásica no eran secundarios a la modulación de la capacidad proliferativa puesto que la inhibición de miR-551a no afectó a la proliferación *in vitro*, mientras que la inhibición de miR-483-5p aumentó la proliferación. Adicionalmente, la sobreexpresión de estos miARN no alteró la capacidad invasiva o tasas apoptóticas de las células cancerosas. Con el fin de determine el/los mecanismo(s) mediante el cual/los cuales estos miARN tienen un impacto sobre la metástasis, se realizaron ensayos para identificar el punto de tiempo durante el proceso metastásico en el que las células que sobreexpresan estos miARN presentan un defecto en la progresión. Sorprendentemente, se observó que tan pronto como 24 horas tras la inyección de células en la circulación portal para ensayos de colonización metastásica hepática, las células que sobreexpresan estos miARN fueron desplazadas en su representación en relación con células que expresan una horquilla de control.

#### EJEMPLO 5

Para dilucidar el/los mecanismo(s) mediante el cual/los cuales estos miARN suprimen la colonización metastásica del hígado, se desarrolló un sistema de cultivo de cortes organotípicos de hígado *in vitro*. Este sistema permitió estudiar acontecimientos tempranos durante la metástasis de hígado tras la diseminación de células individuales de células de cáncer de colon en el microentorno del hígado. Consecuente con estudios previos sobre una selección significativa en la supervivencia celular durante la colonización metastásica, hubo una disminución grande en los números de células dentro del microentorno del hígado en función del tiempo. Las células colonizadoras LvM3b altamente metastásicas persistieron significativamente mejor en el microentorno del hígado que su línea original escasamente metastásica, consecuente con un papel positivo de la persistencia intrahepática en la progresión metastásica.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos para investigar si los efectos de esta red reguladora de miARN sobre la persistencia de células cancerosas están provocados por una disminución de la supervivencia de células cancerosas durante la progresión metastásica. Para cuantificar la muerte celular *in vivo*, se utilizó un indicador de luciferina basado en bioluminiscencia de la actividad de caspasa-3/7.

Más específicamente, células SW480 cuyos miR-483-5p o miR-551a endógenos se inhibieron y posteriormente se introdujeron en el hígado de ratones inmunodeficientes mediante inyección intraesplénica. Entonces, se monitorizó la actividad caspasa *in vivo* relativa en estas células usando una DEVD-luciferina activada por caspasa-3. Se encontró que la inhibición de miARN redujo significativamente la actividad caspasa *in vivo* en células de cáncer de colon durante la fase temprana de la colonización hepática, revelando que la supervivencia del cáncer era el fenotipo suprimido por estos miARN.

Estos hallazgos *in vivo* se corroboraron mediante un sistema de cultivo de cortes organotípicos. En resumen, la supervivencia de las células SW480 en cultivos organotípicos (n=8) cuyos miR-483-5p o miR-551a endógenos se inhibieron mediante pretratamiento con LNA. Se marcaron  $5 \times 10^5$  células con rastreador de células verde (LS-original) o rastreador de células rojo (LvM3b) y se introdujeron en el hígado a través de inyección intraesplénica. Inmediatamente después de la inyección, se extirpó el hígado y se hicieron cultivos de cortes de 150  $\mu$ m usando un cortador de tejido. Se monitorizó la supervivencia de las células en cultivos organotípicos durante hasta 4 días con un microscopio multifotónico. Se realizaron experimentos de intercambio de tintes para excluir efectos de sesgos de tintes. Se mostraron imágenes representativas el día 0 y día 3. Se encontró que la sobreexpresión de ambos microARN en células LS-LvM3b suprimía la persistencia del cáncer de colon mientras que la inhibición de los niveles endógenos de ambos microARN potenciaba la persistencia de células SW480 escasamente metastásicas. Los hallazgos anteriores revelan que miR-483-5p y miR-551a suprimen la colonización metastásica del hígado y la supervivencia de células metastásicas en el hígado, un fenotipo presentado por células de cáncer de colon altamente metastásico.

#### EJEMPLO 6

En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para identificar los efectores posteriores de estos miARN. A través de la obtención del perfil transcriptómico, se identificaron transcritos que estaban regulados por disminución mediante sobreexpresión de cada microARN y que contenían elementos de UTR en 3' o de secuencia codificante (CDS) complementarios a los miARN. De manera interesante, se identificó creatinina cinasa de tipo cerebral (CKB) como

supuesta diana de ambos miARN, sugiriendo que estos miARN, que presentan fenotipos organotípicos e *in vivo* comunes podrían mediar en sus efectos a través de un gen diana común. De hecho, la validación por PCR cuantitativa reveló la supresión de los niveles de transcrito de CKB tras la sobreexpresión de los microARN. Se encontró que los niveles de expresión de CKB en células LvM3b altamente metastásicas se suprimían mediante la sobreexpresión de miR-483-5p y miR-551a. Adicionalmente, se encontró que miR-483 y miR-551a endógenos suprimían los niveles de proteína CKB endógenos. Por ejemplo, se encontró que la expresión de CKB estaba regulada por incremento en células SW480 escasamente metastásicas cuyos miR-483-5p y miR-551a endógenos se inhibieron con LNA. Los ensayos de mutagénesis e indicador basado en luciferasa revelaron que miR-483-5p y miR-551a seleccionaban directamente la UTR en 3' o CDS de CKB. Para ese fin, se llevaron a cabo ensayos de indicador de luciferasa de la secuencia codificante de CKB y UTR en 3'. Se encontró que miR-483-5p y miR-551a seleccionaban como diana regiones complementarias en la secuencia de UTR en 3' y codificante de CKB respectivamente. Los ensayos se realizaron con las regiones complementarias mutadas también y se realizaron al menos 3 veces.

#### 15 EJEMPLO 7

En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para examinar si CKB es suficiente y necesaria para la colonización metastásica del hígado por cáncer de colon.

20 En resumen, se examinó la metástasis del hígado en ratones en los que se inyectaron por vía intraesplénica  $5 \times 10^5$  células SW480 escasamente metastásicas y células que sobreexpresan CKB. Se sacrificaron los ratones a los 28 días tras la inyección y se extirparon los hígados para la obtención de imágenes bioluminiscentes. De manera similar, también se examinó la metástasis del hígado en ratones en los que se inyectaron por vía intraesplénica  $5 \times 10^5$  LvM3b altamente agresivas que expresan una horquilla de control o una horquilla que selecciona como diana CKB. Se sacrificaron estos ratones 21 días tras la inyección tal como se describió anteriormente.

Se encontró que la sobreexpresión de CKB en células SW480 escasamente metastásicas era suficiente para promover la metástasis del hígado en más de 3 veces, mientras que la inactivación de CKB en células SW480 y células LS-LvM3b metastásicas, a través de inactivación de horquilla independiente en cada línea suprimió robustamente la metástasis del hígado en más de 5 veces. Consecuente con los efectos de los miARN, la sobreexpresión de CKB era suficiente para potenciar significativamente la capacidad de las células de cáncer de colon para persistir en el microentorno del hígado y potenció su representación en el hígado, mientras que la inactivación de CKB redujo significativamente la persistencia intrahepática. Para ese fin, se llevó a cabo un estudio para examinar la supervivencia de células SW480 de control y SW480 que sobreexpresan CKB en cortes de hígado organotípicos (n=8), y cultivos de hígado organotípicos de células LvM3b que expresan una horquilla de control u horquilla que selecciona como diana CKB (n=8). Las imágenes tomadas el día 0 y día 2 mostraron que la sobreexpresión de CKB era suficiente para potenciar significativamente la capacidad de células cancerosas. En estos ensayos, se encontró que los valores de P eran menores de 0,001 o 0,0001 basándose en pruebas de la t de Student unilaterales.

40 Para investigar si CKB actúa directamente aguas abajo de miR-483-5p y miR-551a, se sobreexpresó la secuencia codificante de CKB en células que sobreexpresaban miR-483-5p o miR-551a. En resumen, se realizaron ensayos para examinar la progresión metastásica en ratones en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células LvM3b que sobreexpresaban miR-483-5p y miR-551a, con y sin sobreexpresión de CKB. Se monitorizaron las metástasis del hígado mediante obtención de imágenes bioluminiscentes y se sacrificaron los ratones 35 días después de la inyección. Se encontró que la sobreexpresión de CKB era suficiente para rescatar los fenotipos metastásicos de hígado suprimidos de células que sobreexpresan miR-483-5p y miR-551a. A la inversa, la inactivación de CKB en células que presentan inhibición de miR-483-5p o miR-551a endógenos evitó el efecto de metástasis potenciado observado con la inhibición de miR-483-5p o miR-551a. Para ese fin, se realizaron ensayos para examinar la metástasis del hígado en ratones en los que se inyectaron con  $5 \times 10^5$  células SW480 cuyos miR-483-5p y miR-551a endógenos se inhibieron mediante LNA, con y sin inactivación de CKB. Se sacrificaron los ratones después de 28 días y se extirparon los hígados para la obtención de imágenes de bioluminiscencia *ex vivo*. Los resultados de los experimentos de mutación, de aumento y de pérdida de función anteriores, y los análisis de epistasia revelaron que CKB era una diana directa de miR-483-5p y miR-551a y actuando como efector aguas debajo de estos miARN en la regulación de la progresión metastásica del cáncer de colon. En estos ensayos, se encontró que los valores de P eran menores de 0,05 o 0,001 basándose en pruebas de la t de Student unilaterales.

60 Para confirmar adicionalmente los papeles de CKB, se examinaron las actividades caspasa *in vivo* relativas en células que sobreexpresan CKB y SW480 de control en hígados de ratones. Se midieron las actividades mediante bioluminiscencia usando una DEVD-luciferina activada por caspasa-3 y se normalizaron a la señal de bioluminiscencia de luciferina regular (n=3). También se examinó la actividad caspasa-3 *in vivo* relativa en células SW480 que expresan una horquilla de control u horquilla que selecciona como diana CKB y se introdujeron en los hígados de ratones a través de inyección intraesplénica. Se midieron las actividades caspasa el día 1, día 4 y día 7 tras la inyección. Consecuente con los hallazgos anteriores, la sobreexpresión de CKB redujo significativamente, mientras que la inactivación de CKB potenció significativamente, la actividad de caspasa-3/7 *in vivo* en células de cáncer de colon durante la fase inicial de la colonización hepática. En estos ensayos, se encontró que los valores de

P eran menores de 0,05 o 0,001 basándose en pruebas de la t de Student unilaterales. Estos hallazgos revelaron que CKB era un promotor de la supervivencia de cáncer de colon durante la colonización metastásica hepática.

#### EJEMPLO 8

5 Se sabe que CKB regula la reserva de fosfatos de alta energía rápidamente movilizados en tejidos tales como el cerebro y los riñones catalizando la transferencia de un grupo fosfato de alta energía desde fosfocreatina hasta ADP, produciendo ATP y creatina. Se planteó la hipótesis de que la generación por CKB de ATP a partir de fosfocreatina podría proporcionar a las células de cáncer de colon una ventaja energética durante la colonización hepática. Para  
10 determinar si el ATP, el producto final de la catálisis de CKB, podría rescatar la supresión de la metástasis observada tras la inactivación de CKB, se cargaron con ATP células en las que se inactivó CKB antes de la inyección de las células en ensayos de metástasis experimentales. En resumen, se examinó la metástasis del hígado en ratones en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  LvM3b con o sin inactivación de CKB y tratadas previamente con  
15 ATP 100 uM o portador. Se monitorizó la carga metastásica mediante obtención de imágenes bioluminiscentes y se sacrificaron los ratones 21 días después de la inyección. Se encontró que la carga de ATP de las células era suficiente para potenciar significativamente el fenotipo de metástasis suprimido en células empobrecidas en CKB en más de 10 veces. El rescate mediante ATP era específico puesto que la carga de ATP no potenció la actividad metastásica de células que expresaban un control de horquilla corta.

20 Se realizaron estudios similares para determinar si la creatina y fosfocreatina podrían rescatar el fenotipo observado tras la inactivación de CKB. Más específicamente, se realizaron ensayos para examinar la metástasis del hígado en ratones en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células LvM3b tratadas previamente con creatina 10 uM, con los antecedentes de inactivación de CKB. Entonces se sacrificaron los ratones tal como se describió anteriormente y se extrajo el hígado para la obtención de imágenes bioluminiscentes *ex vivo* el día 21 tras la inyección. Además, se  
25 examinó la metástasis de cáncer colorrectal en ratones en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células LvM3b con inactivación de CKB y tratadas previamente con creatina-fosfato 10 uM. Se monitorizó la metástasis del hígado mediante obtención de imágenes bioluminiscentes y se sacrificaron los ratones tal como se describió anteriormente. Se encontró que tanto la creatina como la creatina-fosfato rescataban la supresión de la metástasis.

30 Con el fin de investigar si la metástasis de cáncer de colon podría inhibirse bloqueando el transporte de creatina al interior de células de cáncer de colon, se inhibió el canal de transportador de creatinina SLC6a8 en células LvM3b expresando una horquilla corta que seleccionaba como diana SLC6a8. Entonces se examinó la metástasis del hígado mediante células LvM3b de la misma manera que se describió anteriormente. Se encontró que la inactivación del canal de transportador de creatinina SLC6a8 inhibía la metástasis de cáncer de colon. Estos hallazgos revelan  
35 que las células de cáncer de colon dependen del ATP generado por CKB para su supervivencia durante la colonización hepática.

#### EJEMPLO 9

40 Con el fin de determinar si esta red reguladora de miARN cooperativa que controla la progresión metastásica del cáncer de colon tiene relevancia patológica en seres humanos, se analizaron los niveles de expresión de miR-483-5p y miR-551a en un conjunto de 67 cánceres de colon primarios, así como metástasis de hígado obtenidas de pacientes en MSKCC. Más específicamente, se cuantificaron los niveles de miR-483-5p y miR-551a en 37 muestras de tumor primario y 30 muestras de metástasis de hígado mediante PCR en tiempo real cuantitativa. Consecuente  
45 con un papel supresor de la metástasis de estos miARN durante la progresión metastásica, miR-483 y miR-551a presentaron ambos niveles de expresión significativamente reducidos en metástasis de hígado humanas en relación con cánceres de colon primarios (figura 1a;  $p < 0,05$  para miR-483-5p y  $p < 0,05$  para miR-551a;  $N=67$ ).

50 También se examinaron los niveles de expresión de CKB en las 37 muestras de tumor primario y 30 muestras de metástasis de hígado mediante PCR en tiempo real cuantitativa. De manera importante, se encontró que la expresión de CKB estaba significativamente elevada en metástasis de hígado en relación con cánceres de colon primarios ( $p < 0,05$ ) y su expresión se correlacionaba significativamente de manera contraria con los miARN, consecuente con su selección como diana directa por estos miARN en cáncer de colon humano (figura 1b). Estos hallazgos son consecuentes con análisis histológicos clínicos previos que revelan niveles elevados de proteína CKB  
55 en cáncer en estadio avanzado.

#### EJEMPLO 10

60 En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para investigar el potencial terapéutico de la selección como diana de esta red reguladora de miARN. Para este fin, se les inyectó a los ratones un alto número (500 k) de células LvM3a altamente metastásicas y 24 horas después se les inyectó a los ratones una única dosis intravenosa de virus adenoasociado (VAA) que expresa miR-483-5p y miR-551a a partir de un único transcrito. Se encontró que una única dosis terapéutica de virus adenoasociado (VAA) que suministra ambos miARN reducía de manera drástica y significativa la colonización metastásica en más de 5 veces (figura 1c).  
65

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos para determinar el impacto de la inhibición por moléculas pequeñas de CKB

y la restricción de la disponibilidad de creatina sobre la metástasis de cáncer de colon. La ciclocreatina, que se asemeja a la fosfocreatina, es un análogo de estado de transición de creatinina cinasas. Para examinar el efecto de la ciclocreatina, se llevaron a cabo mediciones bioluminiscentes de la metástasis del hígado en ratones en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células LvM3b y se trataron con ciclocreatina diariamente durante dos semanas. Entonces se sacrificaron los ratones y se extirparon los hígados para la obtención de imágenes *ex vivo* al final del tratamiento. Se encontró que, a pesar de ser un mal inhibidor de CKB (ki de 5000  $\mu\text{M}$ ), el tratamiento de ratones con ciclocreatina redujo significativamente la colonización metastásica y demostró ser superior a la quimioterapia con FOLFOX de referencia actual (figura 1d).

Se llevaron a cabo ensayos similares usando el inhibidor del transportador de creatina ácido beta-guanidinopropiónico (B-GPA). Se usaron mediciones bioluminiscentes para examinar la metástasis del hígado en ratones en los que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células LvM3b y se trataron con B-GPA diariamente durante dos semanas. Se encontró que el tratamiento de ratones con este inhibidor competitivo del canal de transportador de creatinina también reducía significativamente la colonización metastásica (figura 1e).

Usando un enfoque sistemático, se identificaron dos miARN que actuaban como supresores de la colonización metastásica del hígado por células de cáncer de colon. Se encontró que estos miARN seleccionaban como diana de manera convergente CKB, un gen clave que dota a las células que experimentan hipoxia hepática de la capacidad de generar ATP a partir de reservas de fosfocreatina. La selección como diana satisfactoria de esta ruta usando 4 productos terapéuticos independientes que eran más eficaces que el tratamiento de referencia clínico actual, y que no presentaban toxicidad aparente, sugieren que la selección como diana terapéutica de esta ruta en cáncer de colon humano es prometedora. El enfoque de selección/examen génico *in vivo* combinados descrito anteriormente, que se designa como examen multigénico de genes humanos a través de selección en tándem intraorgánica (Multi-Gene Screening of Human genes through intra-Organ Tandem Selection, MUGSHOTS) ha identificado eficazmente reguladores robustos y validados patológicamente de la colonización del hígado y la metástasis por cáncer de colon y tiene el potencial de descubrir reguladores codificantes y no codificantes de la colonización metastásica de cualquier órgano por cualquier tipo de cáncer.

#### EJEMPLO 11

En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para confirmar el potencial terapéutico de la selección como diana del canal de transportador de creatinina SLC6a8 administrando la molécula pequeña B-GPA, que es un inhibidor de SLC6a8. Tal como se mencionó anteriormente, la administración de B-GPA a ratones en los que se inyectaron células de cáncer de colon LvM3b dio como resultado la inhibición de la metástasis de cáncer de colon al hígado tras dos semanas de tratamiento (figura 1e). Para confirmar este efecto terapéutico, se trataron los ratones en los que se inyectaron células de cáncer de colon LvM3b con o bien B-GPA o bien portador de control (PBS) por medio de inyección intraperitoneal diariamente durante tres semanas (figura 2). Se sacrificaron los ratones a las tres semanas y se extrajo el hígado para la obtención de imágenes bioluminiscentes e histología macroscópica.

Se encontró que el tratamiento diario con B-GPA condujo a una reducción significativa de la metástasis de cáncer de colon al hígado, tal como se evaluó mediante obtención de imágenes bioluminiscentes *in vivo* de ratones *in vivo*, obtención de imágenes bioluminiscentes de hígado extraído y examen anatómico macroscópico de hígados extraídos de ratones tratados (figura 2). Más específicamente, las razones de flujo de fotones promedio tal como se miden mediante la obtención de imágenes de bioluminiscencia para el grupo de control (sin tratamiento de B-GPA) y los grupos tratados fueron de aproximadamente 800 y 100, respectivamente. Se encontró que los valores de P eran menores de 0,05 basándose en pruebas de la t de Student unilaterales.

#### EJEMPLO 12

En este ejemplo se llevaron a cabo ensayos para evaluar el beneficio terapéutico de la selección como diana del canal de transportador de creatinina SLC6a8 con inactivación con ARNhc que selecciona como diana SLC6a8.

En resumen, se les inyectaron a los ratones células de cáncer de colon LvM3b que expresan o bien dos ARN en horquilla cortos independientes (shSLC6a8 n.º 4 o shSLC6a8 n.º 5) que seleccionan como diana el canal de transportador de creatinina SLC6a8 o ARN de control (vector pLKO vacío, pedido a Sigma Aldrich) (figura 3a). De nuevo, se monitorizó la metástasis del hígado mediante obtención de imágenes bioluminiscentes y se sacrificaron los ratones tres semanas después de la inoculación de células cancerosas. Se extrajeron los hígados para la histología macroscópica. Se encontró que la inactivación de SLC6a8 con dos ARNhc independientes daba como resultado la inhibición de la metástasis de cáncer de colon (figura 3a).

Para confirmar adicionalmente el beneficio terapéutico de la inactivación de SLC6a8, se inyectó en los ratones otra línea de cáncer de colon independiente (línea celular de cáncer de colon SW480) que expresa un ARN en horquilla corto que selecciona como diana SLC6a8 (shSLC6a8 n.º 2) (figura 3b). Se encontró que la inactivación de SLC6a8 inhibía significativamente la metástasis de células de cáncer de colon SW480 (figura 3b).

Por último, se investigó el beneficio terapéutico de la selección como diana de SLC6a8 en células de cáncer

pancreático. Para lograr esto, se inyectaron en los ratones células de cáncer pancreático PANC1 que expresaban o bien un ARNhc que selecciona como diana SLC6a8 (shSLC6a8 n.º 5) o bien un ARN de control (vector pLKO vacío). Se monitorizó la progresión metastásica mediante obtención de imágenes bioluminiscentes y se sacrificaron los ratones de la misma manera que se describió anteriormente. Se encontró que, a los 28 días, había una reducción significativa en la metástasis de cáncer pancreático en las células tratadas con ARNhc que selecciona como diana SLC6a8, revelando que SLC6a8 es una diana terapéutica para cáncer pancreático.

#### EJEMPLO 13

En este ejemplo, se investigó si la expresión del transportador de creatina SLC6a8 en tumores de cáncer de colon humanos se correlacionaba con la progresión metastásica.

Para lograr esto, se usó PCR en tiempo real cuantitativa para cuantificar la expresión de SLC6a8 en 36 tumores de cáncer de colon primarios y 30 tumores de cáncer de colon metastásicos (figura 4). De hecho, la expresión de SLC6a8 era significativamente mayor en tumores metastásicos (aproximadamente 1,3) en comparación con tumores primarios (aproximadamente 0,5), confirmando adicionalmente el papel central de SLC6a8 en la metástasis (figura 4). Se encontró que los valores de P eran menores de 0,05 basándose en pruebas de la t de Student unilaterales.

#### EJEMPLO 14

Tal como se mencionó anteriormente, se demostró que la inhibición del transportador de creatina SLC6a8 con inactivación mediada por ARNhc daba como resultado la supresión de la metástasis de tanto cáncer de colon, así como cáncer pancreático. También se demostró que la inhibición de SLC6a8 con el inhibidor de molécula pequeña B-GPA daba como resultado un beneficio terapéutico para la metástasis de cáncer de colon *in vivo*. Para evaluar si el tratamiento con B-GPA da como resultado un beneficio terapéutico en cáncer pancreático, se evaluó la capacidad del tratamiento con B-GPA para inhibir la supervivencia de células de cáncer pancreático humanas *in vivo* en ratones.

En resumen, se incubaron células de cáncer pancreático PANC1 durante 48 horas con y sin la presencia de 10 mM de B-GPA, luego se inyectaron en ratones inmunodeficientes ( $5 \times 10^5$  células PANC1 cada ratón; 4 ratones cada uno en la cohorte tratada y sin tratar). Se obtuvieron imágenes de los ratones con obtención de imágenes de bioluminiscencia el día 1 tras la inyección y se normalizó la señal al día cero. Se observó beneficio terapéutico tal pronto como un día después de las inyecciones, con una reducción significativa en la carga tumoral de células de cáncer pancreático *in vivo* tal como se evalúa mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia (figura 4) demostrando el beneficio terapéutico del tratamiento con B-GPA para cáncer pancreático. Más específicamente, las razones de flujo de fotones promedio tal como se miden mediante la obtención de imágenes de bioluminiscencia para el grupo de control (sin tratamiento de B-GPA) y los grupos tratados eran de aproximadamente 2,7 y 1,6, respectivamente. Se encontró que los valores de P eran menores de 0,05 basándose en pruebas de la t de Student unilaterales.

#### EJEMPLO 15

Los ejemplos anteriores demostraron que el tratamiento con B-GPA solo daba como resultado beneficio terapéutico para cáncer de colon y cáncer pancreático. En este ejemplo se investigó si el tratamiento con B-GPA podría potenciar la actividad terapéutica de los agentes de quimioterapia 5'-flourouracilo y gemcitabina. Para lograr esto, se realizaron ensayos de viabilidad celular para comparar la actividad citotóxica de 5'-flourouracilo o gemcitabina solos en comparación con terapia combinada con B-GPA.

En resumen, se sembraron 10000 células PANC1 por triplicado en placas de 96 pocillos y se trataron con diversas concentraciones de gemcitabina (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM, 10000 nM, 100000 nM y 1000000 nM) con o sin 10 mM de B-GPA durante 48 horas. Entonces se sometió a ensayo la viabilidad celular usando el reactivo WST-1 (Roche Applied Science), con absorbancia a 440 nm, un indicador del número de células viables. Tal como se muestra en la figura 6, se encontró que la adición de una concentración terapéutica de B-GPA potenciaba la actividad citotóxica de gemcitabina sobre células de cáncer pancreático PANC1 tal como se evaluó mediante un ensayo de viabilidad celular usando el reactivo WST-1.

Asimismo, la adición de una concentración terapéutica de B-GPA potenció la actividad citotóxica de 5'-flourouracilo en células de cáncer de colon Ls-LvM3b. Para ese fin, se sembraron 10.000 células Ls-LvM3b por triplicado en placas de 96 pocillos y se trataron con diversas concentraciones de 5'-flourouracilo con o sin 10 mM de B-GPA durante 48 horas. Se sometió a ensayo la viabilidad celular de la misma manera que se describió anteriormente con absorbancia a 440 nm, un indicador del número de células viables. Tal como se muestra en la figura 7, estos resultados demuestran que B-GPA potencia la actividad terapéutica de agentes quimioterápicos comúnmente utilizados para el tratamiento de cáncer colorrectal y pancreático.

**Lista de secuencias**

- <110> The Rockefeller University
- <120> TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE COLON
- 5 <130> 070413.20158
- <140> Documento PCT/US13/67860  
<141> 31-10-2013
- 10 <150> 61/720.912  
<151> 31-10-2012
- <150> 61/786.500  
<151> 15-03-2013
- 15 <160> 22
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 25 <220>  
<223> Sintético
- <400> 1  
**gaagacggga ggaaagaagg gag 23**
- 30 <210> 2  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 35 <220>  
<223> Sintético
- <400> 2  
**gaccactct tggttcca 19**
- 40 <210> 3  
<211> 76  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 45 <220>  
<223> Sintético
- 50 <400> 3  
**gagggggaag acgggaggaa agaagggagt ggttccatca cgcctcctca ctcctctcct 60**
- cccgtcttct cctctc 76**
- <210> 4  
<211> 96  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 55 <220>  
<223> Sintético
- 60 <400> 4

ES 2 782 825 T3

	ggggactgcc gggtagaccct ggaaatccag agtgggtggg gccagtctga ccgtttctag	60
	gcgaccact cttggtttcc agggttgccc tggaaa	96
5	<210> 5 <211> 559 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> miR-483-5p sintético	
	<400> 5 cctgccccat ttggggtag gaagtggcac tgcagggcct ggtgccagcc agtccttgcc	60
	cagggagaag cttccctgca ccaggcttcc ctgagaggag gggagggcca agccccact	120
	tgggggaccc ccgtgatggg gtcctgctc cctcctccgg ctgatggcac ctgcccttg	180
	gcacccaag gtggagcccc cagcgacctt ccccttcag ctgagcattg ctgtggggga	240
	gagggggaag acgggaggaa agaagggagt ggttccatca cgctcctca ctcctctcct	300
	cccgtcttct cctctcctgc ccttgtctcc ctgtctcagc agctccaggg gtggtgtggg	360
	cccctccagc ctctagggtg gtgccaggcc agagtccaag ctcagggaca gcagtccctc	420
	ctgtgggggc ccctgaactg ggctcacatc ccacacattt tccaaaccac tcccattgtg	480
	agcctttggt cctggtggtg tccctctggt tgtgggacca agagcttgtg cccatttttc	540
	atctgaggaa ggaggcagc	559
15	<210> 6 <211> 490 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> miR-551a sintético	
	<400> 6 ggagaacctt cagcttcatg tgaccagag actcctgtat gcctggctct gggagtacag	60
	aagggcctag agctgacccc tgccctccga agcccctggg gcaactagatg gatgtgtgcc	120
	agagggtagt agaggcctgg gggtagagcc cagcaccccc ttgcgtaga gacctggggg	180
	accagccagc ccagcaaccc cctcgcggcc gacgcctgag gctgttcctg gctgctccgg	240
	tggctgccag aggggactgc cgggtgaccc tggaaatcca gagtgggtgg ggccagtctg	300
	accgtttcta ggcgaccac tcttggttcc cagggttgcc ctggaaacca cagatgggga	360
	ggggtgatg gcaccagcc tcccccaagc ctgggaaggg accccggatc cccagagcct	420
	ttccctgcct atggagcgtt tctcttgag aacagggggg cctctcagcc cctcaatgca	480
25	agttgctgag	490
30	<210> 7 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintético	
	<400> 7	

**gacccacucu ugguuucca 19**

5 <210> 8  
 <211> 96  
 <212> ARN  
 <213> Sintético

10 <220>  
 <223> Sintético

<400> 8  
 ggggacugcc gggugacccu ggaaauccag aguggguggg gccagucuga ccguuucuaag 60

gcgacccacu cuugguuucc agggguugccc uggaaa 96

15 <210> 9  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Sintético

<400> 9  
**gaagacggga ggaaagaagg gag 23**

25 <210> 10  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Sintético

<400> 10  
**gaagacggga ggaaagaagg gag 23**

35 <210> 11  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Sintético

<400> 11  
**ccggcccaga ttgaaactct cttcactcga gtgaagagag ttcaatctg ggTTTT 57**

50 <210> 12  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 12  
**ccggccgcg tatctggcac aatgactcga gtcattgtgc cagataccgc ggTTTTTg 59**

60 <210> 13  
 <211> 58  
 <212> ADN

<213> Artificial  
<220>  
<223> Sintético  
5  
<400> 13  
ccggcttatt ccctacgtcc tgatcctcga ggatcaggac gtagggaata agtttttg 58

<210> 14  
<211> 58  
<212> ADN  
<213> Artificial  
10  
<220>  
<223> Sintético  
15  
<400> 14  
ccggattacc tggcaagtc cttactcga gtaaaggact tgaccaggta attttttg 58

<210> 15  
<211> 57  
<212> ARN  
<213> Artificial  
20  
<220>  
<223> Sintético  
25  
<400> 15  
ccggcccaga uugaaacucu cuucacucga gugaagagag uuucaaucug gguuuuu 57

<210> 16  
<211> 59  
<212> ARN  
<213> Artificial  
30  
<220>  
<223> Sintético  
35  
<400> 16  
ccggccgcgg uaucuggcac aaugacucga gucauugugc cagauaccgc gguuuuuug 59

<210> 17  
<211> 58  
<212> ARN  
<213> Artificial  
40  
<220>  
<223> Sintético  
45  
<400> 17  
ccggcuuauu ccuacgucc ugauccucga ggauccaggac guagggaua aguuuuug 58

<210> 18  
<211> 58  
<212> ARN  
<213> Artificial  
50  
<220>  
<223> Sintético  
55  
<400> 18  
ccggauuacc uggucaaguc cuuucucga guaaaggacu ugaccaggua auuuuuug 58

60

<210> 19  
<211> 58  
<212> ADN  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> Sintético

10 <400> 19  
ccgggctggt ctacaacaac acctactcga gtaggtgtg ttgtagacca gcttttg 58

<210> 20  
<211> 58  
15 <212> ARN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sintético

20 <400> 20  
ccgggcuggu cuacaacaac accuacucga guagguguug uuguagacca gcuuuuug 58

<210> 21  
<211> 22  
25 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
30 <223> Cebador directo sintético

<400> 21  
ggcagctaca accgcttcaa ca 22

<210> 22  
<211> 22  
35 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
40 <223> Cebador inverso sintético

<400> 22  
caggatggag aagaccacga ag 22

45

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Compuesto que es ácido beta-guanidinopropiónico para su uso en un método de tratamiento de cáncer de colon metastásico, en el que el método comprende la supresión de la colonización metastásica de dicho cáncer de colon metastásico.
- 10 2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que dicha supresión de la colonización metastásica del cáncer de colon metastásico comprende la supresión de la colonización metastásica de dicho cáncer de colon metastásico en el hígado.
- 15 3. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho método de tratamiento comprende disminuir el nivel de expresión o actividad del canal de transporte de creatina SLC6a8.
- 20 4. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nivel de expresión de miR-483-5p y/o miR-551a de dicho cáncer de colon metastásico se ha determinado que está por debajo de un valor de referencia predeterminado o el nivel de expresión de CKB y/o SLC6a8 de dicho cáncer de colon metastásico se ha determinado que está por encima de un valor de referencia predeterminado.
- 25 5. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho tratamiento de cáncer de colon metastásico comprende además un agente terapéutico adicional tal como ciclocreatina, un agente de iARN, un ácido nucleico, un vector, 5-fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecán, capecitabina, gemcitabina, cetuximab, Taxol, Avastin, ácido folínico, regorafenib, Zaltrap, inhibidores de topoisomerasa I, NKTR-102, tivantinib, PX-866, sorafenib, linifanib, inhibidores de cinasas, telatinib, XL281, robatumumab e inhibidores de IGF1-R.
- 30 6. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para tratar cáncer de colon metastásico en un sujeto que se identifica que tiene, o que corre el riesgo de tener, cáncer de colon metastásico, basándose en el nivel de expresión de miR-483-5p, miR-551a, CKB y/o SLC6a8, en el que se identifica que dicho sujeto tiene, o corre el riesgo de tener, cáncer de colon metastásico si dicho nivel de expresión de miR-483-5p y/o miR-551a está por debajo de un valor de referencia predeterminado y/o dicho nivel de expresión de CKB y/o SLC6a8 está por encima de un valor de referencia predeterminado.
- 35 7. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ácido beta-guanidinopropiónico se formula para su inyección en un sujeto.
8. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido beta-guanidinopropiónico se formula para infusión intravenosa.

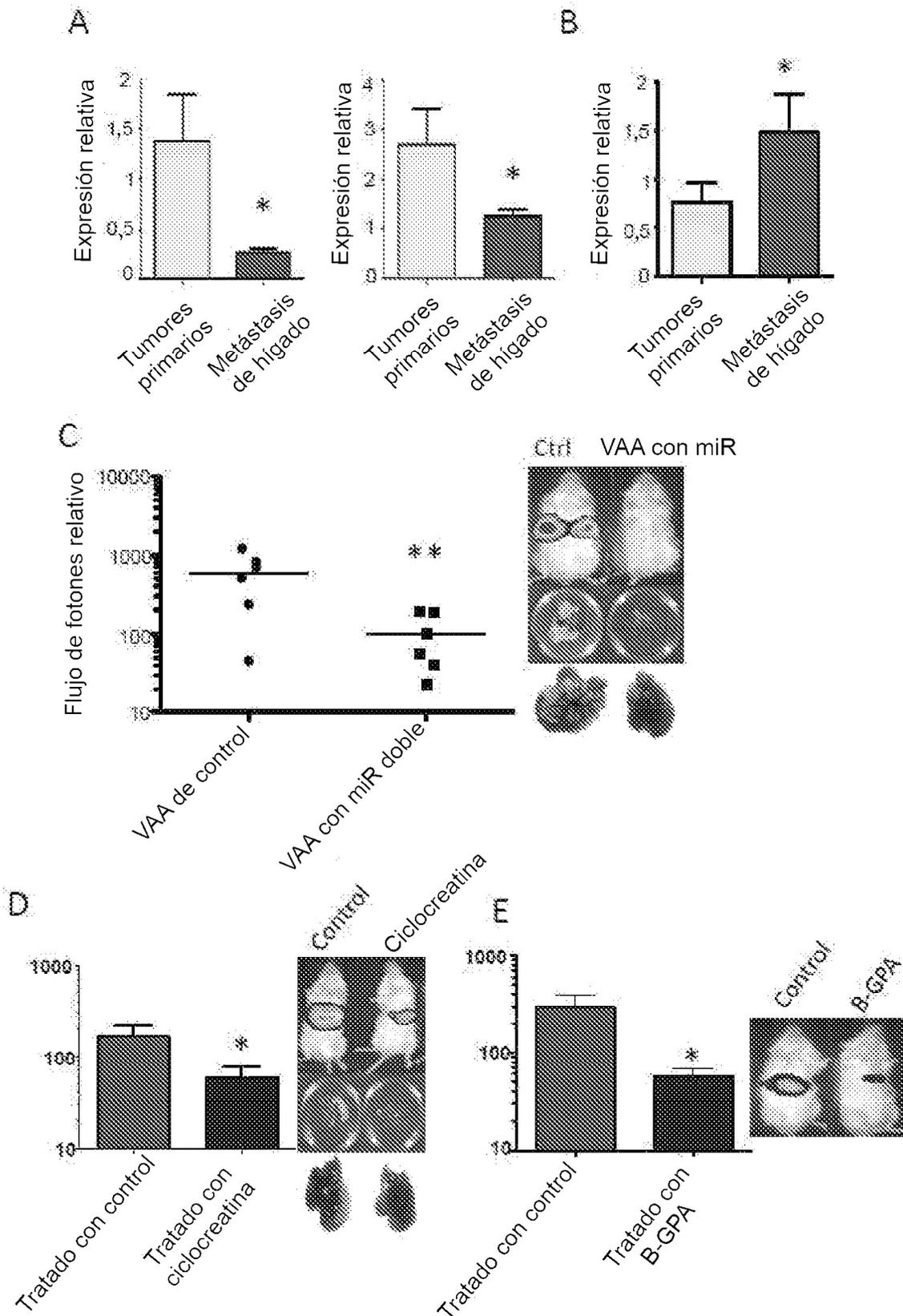


FIG. 1

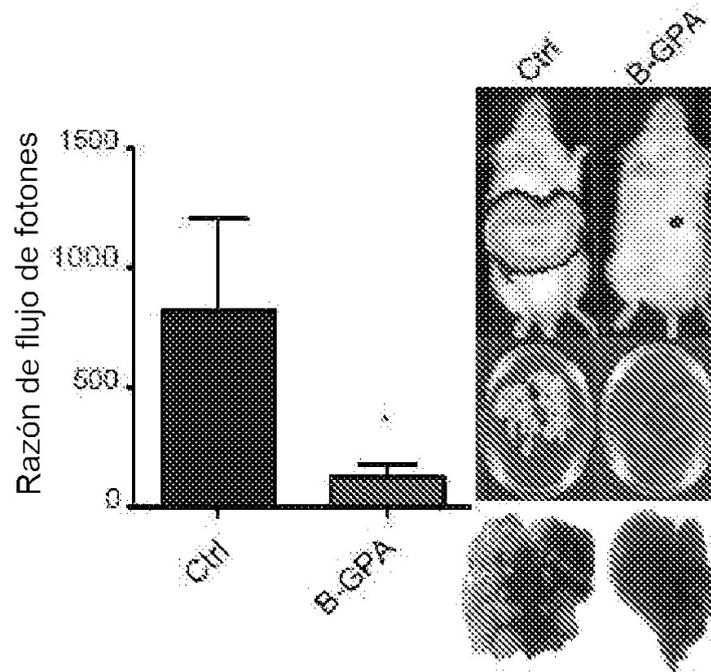


FIG. 2

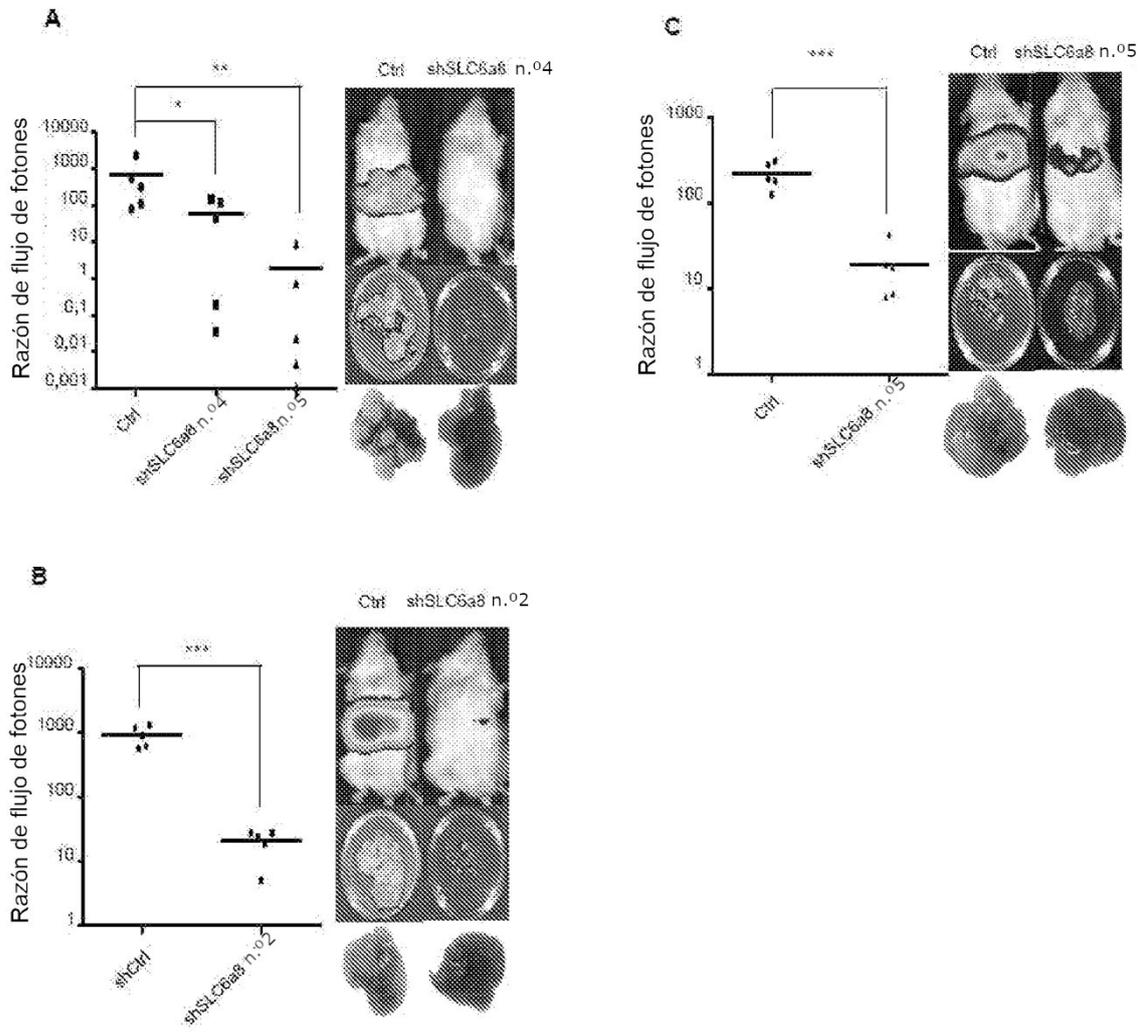


FIG. 3

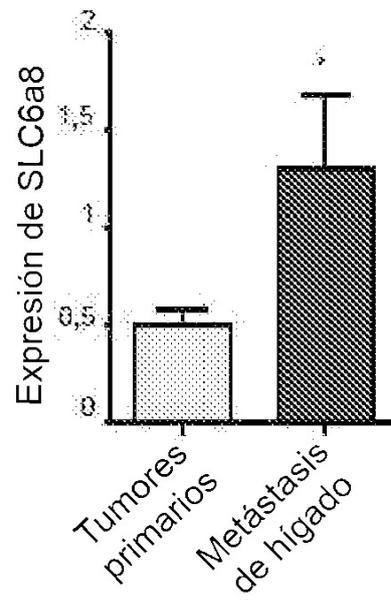


FIG. 4

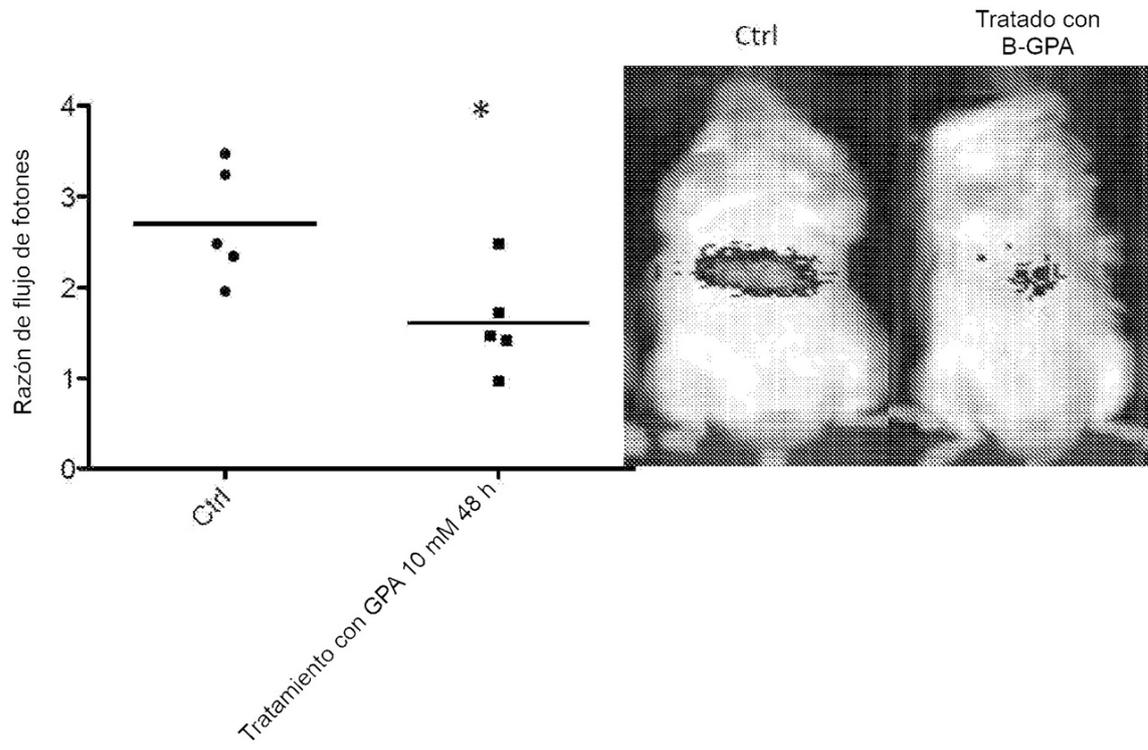


FIG. 5

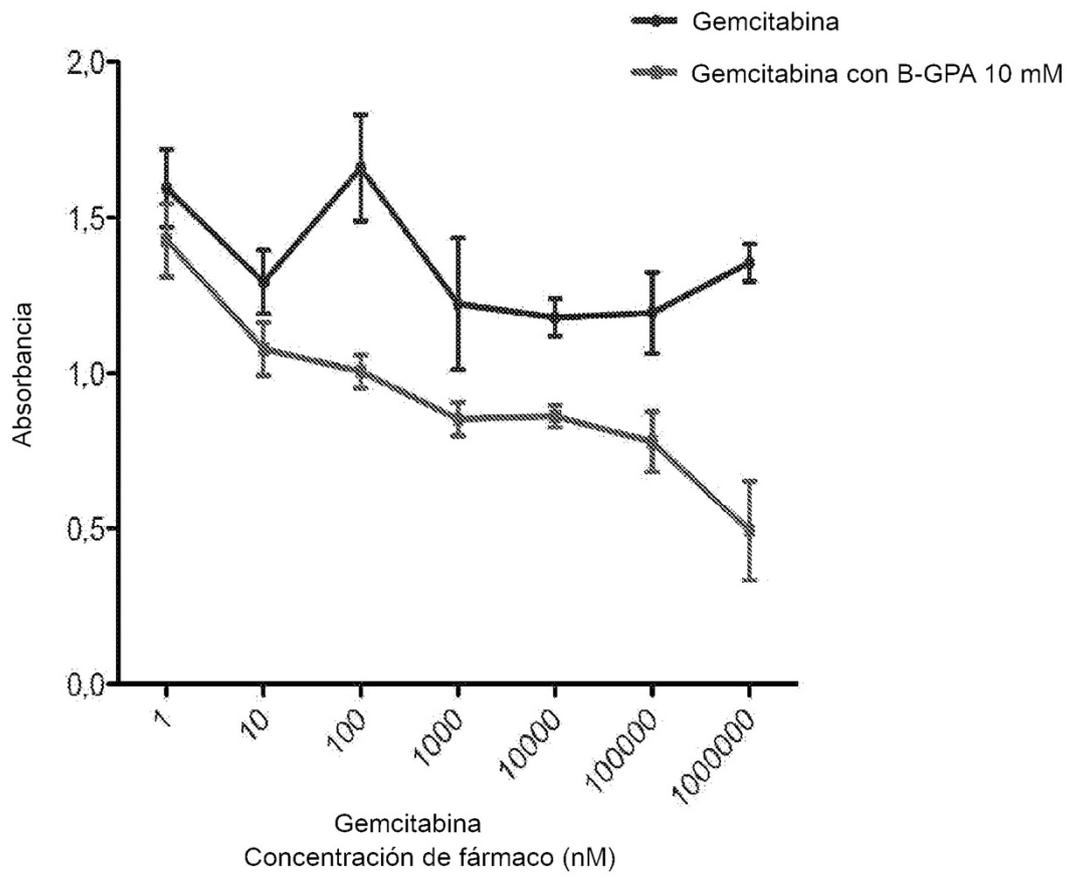


FIG. 6

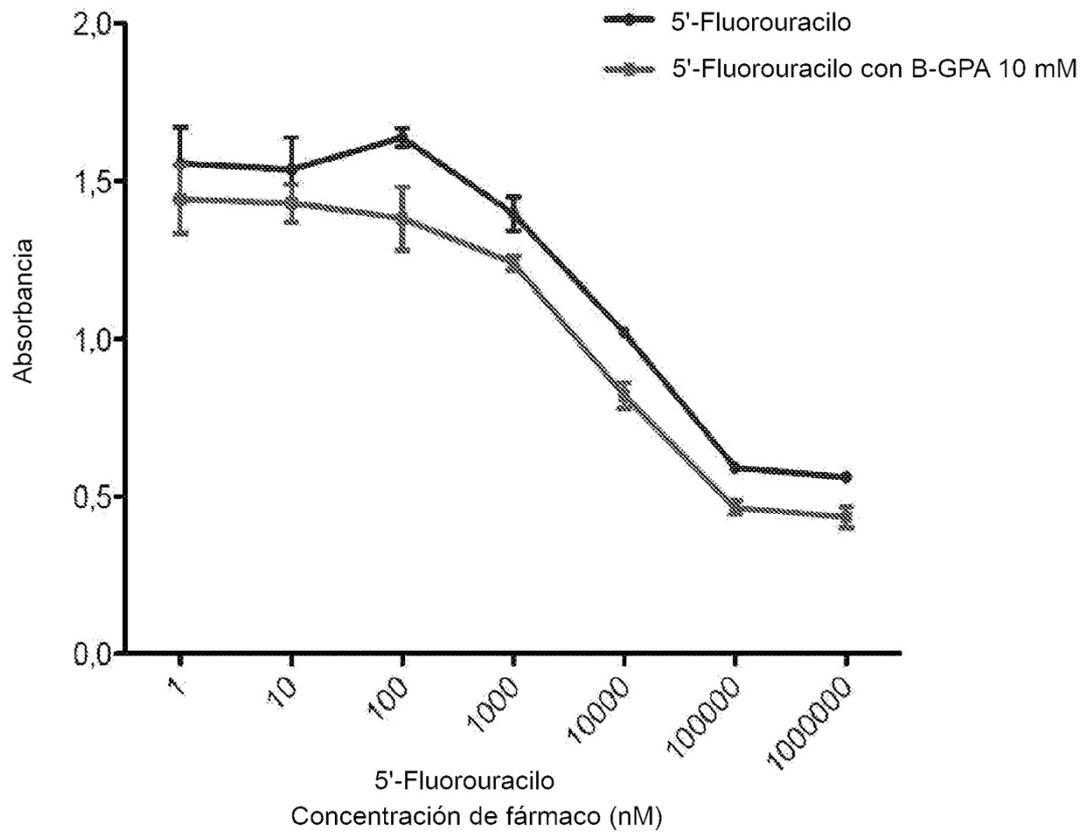


FIG. 7