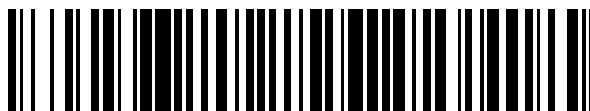


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 165**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7105** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009 E 14170625 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2799557**

54 Título: **Antagonistas de miR-32 para aumentar la respuesta del cáncer de próstata a la apoptosis**

30 Prioridad:

**28.02.2008 US 67518 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.02.2017**

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION (50.0%)  
1524 North High Street  
Columbus, OH 43201, US y  
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF  
AMERICA, AS REPRESENTED BY THE  
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND  
HUMAN SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CROCE, CARLO M. y  
AMBS, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 600 165 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**

Antagonistas de miR-32 para aumentar la respuesta del cáncer de próstata a la apoptosis

**5 Campo técnico**

Esta invención se refiere en general al campo de la biología molecular. Determinados aspectos de la invención incluyen la aplicación en pruebas diagnósticas, la terapéutica y el pronóstico de trastornos relacionados con la próstata.

10

**Antecedentes**

Los perfiles de expresión obtenidos de las micromatrices de genes han proporcionado nuevas perspectivas en la biología del cáncer de próstata. Los patrones de expresión de ARNm en los tumores de próstata se han asociado a la puntuación de Gleason, subtipos de tumor agresivos y la reaparición de la enfermedad. De forma adicional, las firmas de expresión de ARNm obtenidas de tumores primarios han conducido al descubrimiento de nuevos marcadores de diagnóstico candidatos, por ejemplo, la a-metilacil-CoA racemasa, para la detección precoz del cáncer de próstata. Estos hallazgos demuestran que los perfiles de expresión génica de tumores extirpados ofrecen la oportunidad de identificar nuevos marcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata.

15

20

Recientemente se ha descrito una nueva clase de ARN pequeños, denominados microARN, para los cuales se encontró que regulan la función del ARNm modulando la estabilidad del ARNm y la traducción del ARNm a proteína. Los genes de microARN se expresan como ARN precursores grandes, llamados pri-ARNm, que podrían codificar múltiples microARN en una disposición policistrónica. Estos precursores se convierten en microARN maduro de 19 a 25 nucleótidos mediante la enzima nuclear ARNasa III, Drosha y la enzima citosólica ARNasa III, Dicer. Estas dos enzimas y sus cofactores, por ejemplo, DGCR8/Pasha, TRBP y EIF2C2/argonata-2, son componentes claves de la actividad de procesamiento del microARN. Los cambios en sus niveles de expresión pueden alterar la función celular e inducir la transformación celular.

25

30

Se ha demostrado un papel crucial de los microARN en el cáncer. Comúnmente su expresión está alterada en los tumores sólidos humanos. Los perfiles de expresión del microARN también clasifican tumores por el linaje del desarrollo y el estado de diferenciación. Se ha demostrado que múltiples microARN tienen propiedades oncogénicas o actúan como genes supresores tumorales. Estos microARN se han denominado oncomiR. Una alteración de su expresión está unida de forma causal al desarrollo del cáncer.

35

A pesar de la considerable investigación sobre terapias para tratar estas enfermedades, siguen siendo difíciles de diagnosticar y de tratar de forma eficaz, y la mortalidad observada en los pacientes indica que se necesitan mejoras en el diagnóstico, el tratamiento y la prevención del cáncer de próstata.

40

El documento WO 2007/081740 divulga miARN expresados de forma diferencial en el cáncer de próstata, entre ellos miR-32.

**Sumario**

45

Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de un producto del gen miR-32 aislado que comprende un antagonista de miR para aumentar la respuesta de las células del cáncer de próstata a los estímulos apoptóticos como se indica en la reivindicación 1. Las características preferentes se definen en las reivindicaciones 2 a 4.

50

En el presente documento se divulga un método para diagnosticar si un sujeto tiene, o estar en riesgo de desarrollar, un trastorno relacionado con la próstata, determinar un pronóstico para un sujeto con un trastorno relacionado con la próstata, y/o tratar un trastorno relacionado con la próstata en un sujeto que tiene el trastorno relacionado con la próstata, que comprende: medir el nivel de al menos un biomarcador en una muestra de prueba procedente del sujeto, en el que una alteración en el nivel del biomarcador en la muestra de prueba, con respecto al nivel de un biomarcador correspondiente en una muestra de control, es indicativo de que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar el trastorno.

55

En determinadas realizaciones, el nivel del al menos un biomarcador en la muestra de prueba es menor que el nivel del correspondiente biomarcador en la muestra de control.

60

En determinadas realizaciones, el nivel del al menos un biomarcador de la muestra de prueba es mayor que el nivel del correspondiente biomarcador en la muestra de control.

En determinadas realizaciones, el al menos un biomarcador que se expresa de forma diferencial entre el tejido tumoral y el tejido no tumoral, y es uno o más de los miR o variantes funcionales de los mismos, se enumeran en la

65

**Figura 11 - Tabla 2.**

En determinadas realizaciones, el al menos un biomarcador se selecciona de uno o más miR o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 11 - Tabla 2**, que se regulan de forma positiva en tumores de próstata: miR-32, miR-182, miR-31, miR-26a-1/2, miR-200c, miR-375, miR-196a-1/2, miR-370, miR-425, miR-194-1/2, miR-181a-1/2, miR-34b, let-7i, miR-188, miR-25, miR-106b, miR-449, miR-99b, miR-93, miR-92-1/2, miR-125a.

5 En determinadas realizaciones, el al menos un biomarcador se selecciona de uno o más miR, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 11 - Tabla 2**, que se regulan de forma negativa en los tumores de próstata: miR-520h, miR-494, miR-490, miR-133a-1, miR-1-2, miR-218-2, miR-220, miR-128a, miR-221, miR-499, miR-329, miR-340, miR-345, miR-410, miR-126, miR-205, miR-7-1/2, miR-145, miR-34a, miR-487, let-7b.

10 En determinadas realizaciones, el al menos un biomarcador se asocia a enfermedad extra prostática y se selecciona de uno o más de los miR, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 12 - Tabla 3**: miR-101-1/2, miR-200a, miR-200b, miR-196a-1/2, miR-30c-1/2, miR-484, miR-99b, miR-186, miR-195, let-7f-2, miR-34c, miR-371, miR-373, miR-410 y miR-491.

15 En determinadas realizaciones, el al menos un biomarcador muestra una correlación inversa entre miR-1 y los niveles del transcrito del gen diana en tumores de próstata, y se selecciona de uno o más de los genes, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 13A - Tabla 4A**.

20 En determinadas realizaciones, el al menos un biomarcador se selecciona de o uno más de los miR o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 13B - Tabla 4B**: miR-1, miR-31, miR-32, miR-128a, miR-133a, miR-181a, miR-182, miR-194, miR-196a, miR-200c, miR-218-2, miR-220, miR-329, miR-338, miR-369, miR-409-3p, miR-410, miR-448, miR-490, miR-494, miR-499, miR-520h y let-7i.

25 El método divulgado en el presente documento comprende un conjunto de sondas que muestra una correlación negativa con miR-181a en tumores de próstata, en el que conjunto de sondas incluye uno más de los genes, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 14 - Tabla 5**.

30 En determinadas realizaciones, el al menos un biomarcador es un biomarcador sensible a andrógenos, y se selecciona de uno o más de los miR, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 15 - Tabla 6**: miR-338, miR-126-5p, grupo miR-181b-1, grupo miR181c, miR-219-5p y grupo miR221.

35 En determinadas realizaciones, el al menos un biomarcador se selecciona de uno o más de los miR, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 16 - Tabla 7**: miR-126, miR-146b, miR-146b, miR-181b-1, miR-181b-1, miR-181b-1, miR-181b-1, miR-181c, miR-181c, miR-219-1, miR-219-1, miR-219-1, miR-221, miR-221, miR-221, miR-338, miR-338.

40 En determinadas realizaciones, el al menos un biomarcador se selecciona de uno o más de los miR, o variantes funcionales de los mismos, que están regulados de forma positiva en tumores con invasión perineural en cánceres de próstata, enumerados en la **Figura 23 - Tabla 9**: miR-224, miR-21, miR-10 (a/b), miR-125b (-1/2), miR-30a/b/c-2/d, miR-100, miR-24 (-1/2), miR-15a-2, miR-191, miR-99b, miR-27a/b, miR-26a (-1/2), miR-126, miR-145, miR-195, miR-181a-1, miR-199b, miR-151, let-7g.

45 En determinadas realizaciones, el al menos un biomarcador expresado de forma diferencial entre tejidos de tumor PNT y tejidos de tumor no PNT, y es uno o más de los genes, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 24 - Tabla 12**.

50 El método divulgado en el presente documento comprende una expresión aumentada de uno o más de: Dicer y DGCR8 en tumores de próstata, y/o Dicer y EIF2C2, que codifica argonauta-2, en tumores con una puntuación de Gleason elevada.

En determinadas realizaciones, la muestra comprende una muestra de sangre.

55 En determinadas realizaciones, la muestra comprende una o más muestras de suero o de plasma sanguíneo.

Se divulga en el presente documento un biomarcador que comprende al menos un biomarcador expresado de forma diferencial entre tejido tumoral y tejido no tumoral, y es uno o más de los miR, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 11 - Tabla 2**.

60 Se divulga en el presente documento un biomarcador que comprende al menos un biomarcador que selecciona de uno o más miR o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 11 - Tabla 2**, que están regulados de forma positiva en tumores de próstata: miR-32, miR-182, miR-31, miR-26a-1/2, miR-200c, miR-375, miR-196a-1/2, miR-370, miR-425, miR-194-1/2, miR-181a-1/2, miR-34b, let-7i, miR-188, miR-25, miR-106b, miR-449, miR-99b, miR-93, miR-92-1/2, miR-125a.

65

- 5 Se divulga en el presente documento un biomarcador que comprende al menos un biomarcador que selecciona de uno o más miR, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 11 - Tabla 2**, que están regulados de forma negativa en tumores de próstata: miR-520h, miR-494, miR-490, miR-133a-1, miR-1-2, miR-218-2, miR-220, miR-128a, miR-221, miR-499, miR-329, miR-340, miR-345, miR-410, miR-126, miR-205, miR-7-1/2, miR-145, miR-34a, miR-487, let-7b.
- 10 Se divulga en el presente documento un biomarcador que comprende al menos un biomarcador asociado a enfermedad extraprostática, y se selecciona de uno o más de los miR, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 12 - Tabla 3**: miR-101-1/2, miR-200a, miR-200b, miR-196a-1/2, miR-30c-1/2, miR-484, miR-99b, miR-186, miR-195, let-7f-2, miR-34c, miR-371, miR-373, miR-410 y miR-491.
- 15 Se divulga en el presente documento un biomarcador que se selecciona de uno o más de los miR, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 13B - Tabla 4B**: miR-1, miR-31, miR-32, miR-128a, miR-133a, miR-181a, miR-182, miR-194, miR-196a, miR-200c, miR-218-2, miR-220, miR-329, miR-338, miR-369, miR-409-3p, miR-410, miR-448, miR-490, miR-494, miR-499, miR-520h y let-7i.
- 20 Se divulga en el presente documento un biomarcador que comprende un conjunto de sondas que muestra una correlación negativa con miR-181a en tumores de próstata, en el que el conjunto de sondas incluye uno o más de los genes, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 14 - Tabla 5**.
- 25 Se divulga en el presente documento un biomarcador que comprende al menos un biomarcador que es un biomarcador sensible a andrógenos y selecciona de uno o más de los miR, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 15 - Tabla 6**: miR-338, miR-126-5p, grupo miR-181b-1, grupo miR181c, miR-219-5p y grupo miR221.
- 30 Se divulga en el presente documento un biomarcador que comprende al menos un biomarcador que se selecciona de uno o más de los miR, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 16 - Tabla 7**: miR-126, miR-146b, miR-146b, miR-181b-1, miR-181b-1, miR-181b-1, miR-181b-1, miR-181b-1, miR-181c, miR-181c, miR-219-1, miR-219-1, miR-219-1, miR-221, miR-221, miR-221, miR-221, miR-338, miR-338.
- 35 Se divulga en el presente documento un biomarcador que comprende al menos un biomarcador que se selecciona de uno o más de los miR, o variantes funcionales de los mismos, que están regulados de forma positiva en tumores con invasión perineural en cánceres de próstata, enumerados en la **Figura 23 - Tabla 9**: miR-224, miR-21, miR-10 (a/b), miR-125b (-1/2), miR-30a/b/c-2/d, miR-100, miR-24 (-1/2), miR-15a-2, miR-191, miR-99b, miR-27a/b, miR-26a (-1/2), miR-126, miR-145, miR-195, miR-181a-1, miR-199b, miR-151, let-7g.
- 40 Se divulga en el presente documento un biomarcador que comprende al menos un biomarcador que se expresa de forma diferencial entre tejido de tumor PNT y tejido de tumor no PNT, y es uno o más de los genes, o variantes funcionales de los mismos, enumerados en la **Figura 24 - Tabla 12**.
- 45 Se divulga en el presente documento un biomarcador que comprende una expresión aumentada de uno o más de: Dicer y DGCR8 en tumores de próstata, y/o Dicer y EIF2C2, que codifica argonauta-2, en tumores con una puntuación de Gleason elevada.
- 50 Se divulga en el presente documento una firma de expresión de microARN distinta en tumores de próstata que comprende alteraciones en la expresión de uno o más biomarcadores que regulan el procesamiento en tumor de microARN.
- 55 Se divulga en el presente documento un método para incidir en la abundancia de transcrito y/o la expresión de proteína de los ARNm diana en la próstata, que comprende desregular uno o más microARN en un sujeto que lo necesite.
- 60 El método divulgado en el presente documento comprende inhibir la expresión de proteínas de genes relacionados con el cáncer.
- El método divulgado en el presente documento comprende alterar la expresión de un o más de miR-32 y miR-106b para inhibir la expresión de proteínas de genes relacionados con el cáncer.
- 65 En otro aspecto, se describe en el presente documento un uso de un perfil de expresión de genes a gran escala de los ARN que codifican microARN y proteínas, para identificar las alteraciones en la función de microARN que se producen en los tumores de próstata humanos.

- En otro aspecto, se describe en el presente documento un firma génica tumoral para un trastorno relacionado con la próstata que comprende: uno o más de: miR-32 regulado de forma positiva, seguido de miR-182, miR-31, miR-26a, miR-200c, miR-196a; y el grupo miR-106b-25; y/o uno o más de los miR-520h, miR-494, miR-490 y el grupo miR-1-133a, regulados de forma negativa significativamente.
- 5 Se divulga en el presente documento una firma de tumor asociada a extensión de enfermedad extraprostática con un bajo margen de error, que comprende a miR-101.
- 10 En determinadas realizaciones, el biomarcador comprende expresión del gen hospedador en tumores de próstata que está aumentada en tumores de próstata.
- 15 En determinadas realizaciones, el biomarcador incluye uno o más de: C9orf5 y MCM7, que están regulados de forma positiva, y cuya expresión se correlaciona con la expresión de los microARN intrónicos, miR-32 y el grupo miR-106b-25, respectivamente.
- 20 Se divulga en el presente documento un uso de miR-106b para dirigirse a los genes E2F1 y/o CDKN1A en las células de cáncer de próstata y/o el uso en la inhibición de la expresión de proteínas de los genes E2F1 y/o CDKN1A.
- 25 Se divulga en el presente documento la regulación de uno o más de XP06 y PTK9 alterando la expresión de miR-1 en las células de cáncer de próstata.
- Se divulga en el presente documento un uso de la unión de los microARN a secuencias 3'UTR, para conducir a la degradación y/o acumulación de ARNm que se tienen como objetivo en células de mamífero.
- 30 Se divulga en el presente documento un uso de una correlación inversa y/o positiva entre un microARN y un ARNm en un tejido humano, predictiva de un gen diana de microARN.
- Se divulga en el presente documento un método para identificar los ARNm que están regulados por microARN, que comprende llevar a cabo un análisis de correlación de microARN y de la expresión ARNm en tejido humano.
- 35 Se divulga en el presente documento un inhibidor antisentido de la expresión de miR, que comprende uno o más de miR-32 y miR-106b.
- Se divulga en el presente documento un biomarcador oncomiR de un trastorno o enfermedad de la próstata, que comprende uno o más de: miR-1, miR-32 y grupo miR-106b-25.
- 40 En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para regular la expresión de proteínas en células de cáncer de próstata, que comprende modular la expresión de uno o más de: miR-1, miR-32 y el grupo miR-106b-25 en las células de cáncer de próstata.
- 45 Se divulga en el presente documento una composición para reprimir la expresión de uno o más de exportina-6 y PTK9 en células de cáncer de próstata, comprendiendo la composición a miR-1 o a una variante funcional del mismo.
- 50 Se divulga en el presente documento un método para regular uno o más niveles de proteína de E2F1 y p21/WAF1 en un sujeto que lo necesite, que comprende utilizar miR-106b o una variante funcional del mismo.
- Se divulga en el presente documento una composición que comprende a miR-106b antisentido, útil para aumentar los niveles de proteína de p21/WAF1 y/o E2F1 en una célula de cáncer de próstata en un sujeto que lo necesite.
- 55 En determinadas realizaciones, el método comprende determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de próstata, que comprende medir el nivel de al menos un biomarcador en una muestra de prueba procedente del sujeto, en el que: i) el biomarcador está asociado a un pronóstico adverso en cáncer de próstata; y ii) una alteración al nivel del al menos un biomarcador en la muestra de prueba de próstata, con respecto al nivel de un biomarcador correspondiente en una muestra de control, es indicativa de un pronóstico adverso.
- 60 El método que se divulga en el presente documento comprende diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, cáncer de próstata, que comprende: (1) realizar transcripción inversa de ARN procedente de una muestra de prueba obtenida de un sujeto, para proporcionar un conjunto de oligodeoxinucleótidos diana; (2) hibridar los oligodeoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos para miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de prueba; y (3) comparar el perfil de hibridación de la muestra de prueba con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control, en el que una alteración en la señal de al menos un miARN es indicativa de que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar, cáncer de
- 65 próstata.

En determinadas realizaciones, la señal de al menos un miARN, con respecto a la señal generada a partir de la muestra de control, está regulada de forma negativa, y/o en las que la señal de al menos un miARN, con respecto a la señal generada a partir de la muestra de control, está regulada de forma positiva.

5 En determinadas realizaciones, una alteración en la señal de al menos un biomarcador seleccionado del grupo enumerado en: **Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4A, Tabla 4B, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 9 o Tabla 10** es indicativa de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer de próstata con un pronóstico adverso.

10 Se divulga en el presente documento un método para tratar el cáncer de próstata en un sujeto que tiene un cáncer de próstata, en el que al menos un biomarcador está regulado de forma negativa o regulado de forma positiva en las células cancerosas del sujeto con respecto a las células de control, que comprende: (1) cuando el al menos un biomarcador está regulado de forma negativa en las células cancerosas, administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un biomarcador aislado, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo, de forma que la proliferación de las células cancerosas en el sujeto esté inhibida; o (2) cuando el al menos un biomarcador está regulado de forma positiva en las células cancerosas, administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un biomarcador, de forma que la proliferación de las células cancerosas en el sujeto esté inhibida.

20 Se divulga en el presente documento un método para tratar el cáncer de próstata en un sujeto, que comprende: (1) determinar la cantidad de al menos un biomarcador en células del cáncer de próstata, con respecto a las células de control; y (2) alterar la cantidad de biomarcador expresada en las células de cáncer de próstata mediante: (i) la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un biomarcador aislado, si la cantidad del biomarcador expresado en las células cancerosas es menor que la cantidad del biomarcador expresado en las células de control; o (ii) administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un biomarcador, si la cantidad del biomarcador expresado en las células cancerosas es mayor que la cantidad del biomarcador expresado en las células de control.

30 En otro aspecto, se describe en el presente documento una composición farmacéutica para tratar el cáncer de próstata, que comprende al menos un biomarcador aislado y un transportador farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica incluye el al menos un biomarcador aislado que corresponde con un biomarcador que está regulado de forma negativa en las células de cáncer de próstata con respecto a las células de control.

35 En determinadas realizaciones, el producto farmacéutico comprende al menos un compuesto inhibidor de la expresión de miR y un transportador farmacéuticamente aceptable.

40 En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para identificar un agente anti cáncer de próstata, que comprende proporcionar un agente de prueba a una célula y medir el nivel de al menos un biomarcador asociado a niveles de expresión disminuidos en células de cáncer de próstata, en el que un aumento en el nivel del biomarcador en la célula, con respecto a una célula de control, es indicativo de que el agente de prueba es un agente anti cáncer de próstata.

45 En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para identificar un agente anti cáncer de próstata, que comprende proporcionar un agente de prueba a una célula y medir el nivel de al menos un biomarcador asociado a niveles de expresión aumentados en células de cáncer de próstata, en el que una disminución del nivel del biomarcador en la célula, con respecto a una célula de control, es indicativo de que el agente de prueba es un agente anti cáncer de próstata.

50 En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para evaluar la eficacia de una terapia para prevenir, diagnosticar y/o tratar una enfermedad asociada al cáncer de próstata, que comprende: i) someter a un animal a una terapia cuya eficacia se está evaluando, y ii) determinar el nivel de eficacia del tratamiento que se está probando en el tratamiento o prevención de la enfermedad, evaluando al menos un biomarcador enumerado en una o más de la **Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4A, Tabla 4B, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 9 o Tabla 10**.

55 En determinadas realizaciones, el agente terapéutico candidato comprende uno o más de: composiciones farmacéuticas, composiciones nutracéuticas y composiciones homeopáticas.

En determinadas realizaciones, la terapia que se está evaluando es para su uso en un sujeto humano.

60 Se divulga en el presente documento un artículo de fabricación que comprende: al menos un reactivo de captura que se une a un marcador para una enfermedad asociada al cáncer de próstata, que comprende al menos un biomarcador enumerado en una o más de la **Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4A, Tabla 4B, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 9 o Tabla 10**.

65

Se divulga en el presente documento un kit para cribar un compuesto candidato para un agente terapéutico para tratar una enfermedad asociada al cáncer de próstata, en el que el kit comprende: uno o más reactivos de al menos un biomarcador enumerado en una o más de la **Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4A, Tabla 4B, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 9 o Tabla 10**, y una célula que expresa al menos un biomarcador.

5 En determinadas realizaciones, la presencia del biomarcador se detecta usando un reactivo que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une de forma específica con al menos un biomarcador.

10 Se divulga en el presente documento un uso de un agente que interfiere con una ruta de señalización de respuesta a la enfermedad asociada al cáncer de próstata, para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir, revertir o limitar la gravedad de la complicación de la enfermedad en un individuo, en el que el agente comprende al menos un biomarcador enumerado en una o más de la **Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4A, Tabla 4B, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 9 o Tabla 10**.

15 Se divulga en el presente documento un método para tratar, prevenir, revertir o limitar la gravedad de una complicación de la enfermedad asociada al cáncer de próstata en un individuo que lo necesite, que comprende: administrar al individuo un agente que interfiere con al menos una cascada de respuesta a la enfermedad asociada al cáncer de próstata, en el que el agente comprende al menos un biomarcador enumerado en una o más de la **Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4A, Tabla 4B, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 9 o Tabla 10**.

20 Se divulga en el presente documento un uso de un agente que interfiere con al menos una cascada de respuesta a la enfermedad asociada al cáncer de próstata, para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir, revertir o limitar la gravedad de una complicación de la enfermedad relacionada con el cáncer de próstata en un individuo, en el que el agente comprende al menos un biomarcador enumerado en una o más de la **Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4A, Tabla 4B, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 9 o Tabla 10**.

Se divulga en el presente documento una composición que comprende un inhibidor antisentido de uno o más de miR-1, miR-32 y miR-106b.

30 Se divulga en el presente documento un método para tratar un trastorno de la próstata en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición.

En determinadas realizaciones, la composición se administra de forma profiláctica.

35 En determinadas realizaciones, la administración de la composición retrasa la aparición de uno o más síntomas del trastorno.

En determinadas realizaciones, la administración del péptido inhibe el desarrollo del cáncer de próstata.

40 En determinadas realizaciones, la administración del péptido inhibe el crecimiento tumoral.

En determinadas realizaciones, la administración del péptido inhibe la infección.

45 En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para detectar la presencia de cáncer de próstata en una muestra biológica, comprendiendo el método: a) exponer la muestra biológica que se sospecha que contiene cáncer de próstata a un marcador para esto; y b) detectar la presencia o ausencia del marcador, si lo hay, en la muestra.

50 En determinadas realizaciones, el marcador incluye un marcador detectable.

En determinadas realizaciones, el método comprende además adicionalmente comparar la cantidad del marcador en la muestra biológica procedente del sujeto con una cantidad del marcador en una muestra biológica correspondiente procedente de un sujeto normal.

55 En determinadas realizaciones, el método comprende adicionalmente recoger una pluralidad de muestras biológicas de un sujeto en distintos puntos temporales y compararlas con la cantidad del marcador en cada muestra biológica para determinar si la cantidad del marcador aumenta o disminuye en el sujeto a lo largo del tiempo.

60 Se divulga en el presente documento un método para tratar un cáncer de próstata en un sujeto, comprendiendo el método: administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista del receptor de la próstata.

En determinadas realizaciones, el agonista del receptor es un inhibidor antisentido de uno o más de los miR1, miR-21 y miR-106b.

65

Se divulga en el presente documento un uso para fabricar un fármaco para el tratamiento del cáncer de próstata, que comprende una molécula de ácido nucleico elegida entre los miR mostrados en la **Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4A, Tabla 4B, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 9 o Tabla 10**, una secuencia obtenida de la misma, una secuencia complementaria procedentes de tal miR y una secuencia obtenida de tal secuencia complementaria.

5 En determinadas realizaciones, el uso incluye el fármaco que comprende una molécula de ácido nucleico que presenta una secuencia elegida entre: los miR enumerados en la **Tabla 2**, una secuencia obtenida de tales miR, la secuencia complementaria de tales miR y una secuencia obtenida de tal secuencia complementaria.

10 En otro aspecto, se describe en el presente documento un método *in vitro* para identificar agentes terapéuticos eficaces o combinaciones de agentes terapéuticos para inducir la diferenciación de células del cáncer de próstata, comprendiendo el método las fases de: i) cultivar células obtenidas de un tumor de próstata, ii) añadir al menos un compuesto al medio de cultivo de la línea celular, iii) analizar la evolución del nivel de expresión de al menos un miR entre las fases (i) y (ii) y iv) identificar compuestos o combinaciones de compuestos, que inducen un cambio en el nivel de expresión del miR entre las fases (i) y (ii).

15 En determinadas realizaciones, la fase (iii) incluye el análisis del nivel de expresión de al menos un miR.

En determinadas realizaciones, la fase (iv) incluye la identificación de los compuestos o combinaciones de compuestos, que modulan el nivel de expresión de al menos un miR.

20 En determinadas realizaciones, la fase (iv) incluye la identificación de compuestos o combinaciones de compuestos, que reducen el nivel de expresión de al menos un miR.

En determinadas realizaciones, el compuesto es un agente terapéutico para el tratamiento del cáncer.

25 En otros aspecto, se describe en el presente documento un método para clasificar un tejido de próstata procedente de un sujeto que comprende: a) medir la expresión de una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo enumerado en **Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4A, Tabla 4B, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 9 o Tabla 10** en una población de células de prueba, en el que al menos una célula en dicha población de células de prueba tiene la capacidad de expresar una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo enumerado en la **Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4A, Tabla 4B, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 9 o Tabla 10**; b) comparar la expresión de la secuencia (o secuencias) de ácido nucleico con la expresión de la secuencia (o secuencias) de ácido nucleico en una población de células de referencia que comprende al menos una célula para la cual se conoce una clasificación del cáncer de próstata; y c) identificar una diferencia, si está presente, en los niveles de expresión de una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en, la población de células de prueba y la población de células de referencia, clasificando de este modo el cáncer de próstata en un sujeto.

40 En determinadas realizaciones, una diferencia en la expresión del ácido nucleico (o ácidos nucleicos) en la población de células de prueba, en comparación con la población de células de referencia, indica que la población de células de prueba tiene una clasificación distinta que las células de la población de células de referencia.

En determinadas realizaciones, un patrón de expresión similar del ácido nucleico (o ácidos nucleicos) en la población de células de prueba en comparación con la población de células de referencia, indica que la población de células de prueba tiene la misma clasificación que las células de la población de células de referencia.

45 En determinadas realizaciones, la población de células de referencia es una pluralidad de células o una base de datos.

50 En determinadas realizaciones, la población de células de referencia se selecciona del grupo que consiste: una población de células de referencia clasificada como una población de células procedente de tejido de próstata normal, una población de células de referencia clasificada como una población de células procedente de tejido de próstata benigno y una población de células de referencia clasificada como una población de células procedente de tejido de próstata maligno.

55 Diversos objetivos y ventajas de la presente invención se harán obvios para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferente, cuando se lea a la luz de los dibujos adjuntos.

#### Breve descripción de los dibujos

60 La patente o el archivo de solicitud pueden contener uno o más dibujos realizados en color y/o una o más fotografías. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con un dibujo (o dibujos) en color y/o una fotografía (o fotografías) la proporcionará la Oficina de Patentes bajo solicitud y pago de las tasas necesarias.

65 **Figuras 1A-1B:** Análisis de la relación entre la abundancia del transcrito de los microARN y sus ARNm dianas respectivos en tejidos de próstata. Se muestra la distribución global de los coeficientes de correlación de Pearson entre los ARNm y miR-106b (**Fig. 1A**) y entre los ARNm y los miR-181a (**Fig. 1B**). Las curvas con líneas negras



muestran la distribución de los coeficientes de correlación para todos los ARNm. Las curvas de líneas rojas muestran la distribución de los coeficientes de correlación solo para los ARNm que son una diana predicha de miR-106b o miR-181a. Las curvas de líneas rojas tienen un saliente adicional (flecha) que indica un enriquecimiento de ARNm dianas, cuyos niveles de transcrito se correlacionan de forma negativa con los niveles de transcrito del microARN.

**Figuras 2A-2B:** Inhibición de la expresión de proteína mediante miR-1 y miR-106b. Se transfectaron células de cáncer de próstata humano LNCaP y PC-3 con precursor de microARN (miR-1 y miR-106b) o microARN antisentido (miR-1 antisentido y miR-106b antisentido), o sus controles de vector respectivos, microARN precursor desorganizado (P desorganizado) y microARN antisentido desorganizado (A desorganizado). Los extractos de proteína se prepararon 48 horas tras transfección y la expresión de proteínas se examinó mediante análisis de transferencia de Western. Carga: 50 µg de proteína por calle.

**Figuras 3A-3B:** miR-106b inhibe la expresión de la proteína E2F1 mediante un mecanismo mediado por la 3'UTR.

**Figura 3A:** Las células de cáncer de próstata humano LNCaP y PC-3 se transfectaron con precursor de microARN (miR-106b) o microARN antisentido (miR-106b antisentido), o sus controles de vector respectivos, microARN precursor desorganizado (P desorganizado) y microARN antisentido desorganizado (A desorganizado). Los extractos de proteína se prepararon 48 horas después de la transfección y la expresión de proteína se examinó mediante análisis de transferencia de Western. Para obtener los valores de intensidad relativa, se normalizó la expresión de E2F1 con β-actina.

**Figura 3B:** Se cotransfectaron construcciones pGL3 indicadoras de luciferasa que contenían la secuencia diana 3'UTR, de tipo silvestre o mutante, de miR-106b en el gen de E2F1 en células LNCaP con ya sea el control negativo de microARN precursor o el precursor de miR-106b (cada uno n = 3). Para comparación, también se transfectaron células con el vector de control pGL3 que no contenía la 3'UTR. Tras 24 horas, se determinó la actividad luciferasa en los extractos celulares. En presencia de la 3'UTR de E2F1 de tipo silvestre, la transfección con miR-106b precursor condujo a una inhibición significativa del indicador de luciferasa cuando se comparó con el vector de control (P = 0,045, prueba t de dos colas).

**Figuras 3C-3D:** miR-32 inhibe la expresión de proteína Bim por un mecanismo mediado por la 3'UTR.

**Figura 3C:** Se transfectaron células de cáncer de próstata humano LNCaP y PC-3 con precursor de microARN (miR-32) o microARN antisentido (miR-32 antisentido), o con sus controles de vector respectivos, microARN precursor desorganizado (P desorganizado) y microARN antisentido desorganizado (A desorganizado). 48 horas después de la transfección se prepararon extractos de proteína y se examinó la expresión de proteína mediante análisis de transferencia de Western. Para obtener los valores de intensidad relativa, se normalizó la expresión de Bim con respecto a β-actina.

**Figura 3D:** Se cotransfectaron en células LNCaP construcciones pGL3 indicadoras de luciferasa que contenían la secuencia diana 3'UTR de tipo silvestre o mutante de miR-32 en el gen BCL2L11 (Bim) con control negativo de microARN precursor o con precursor de miR-32 (cada uno n = 3). Para comparación, también se transfectaron células con el vector de control pGL3 que no contenía la 3'UTR. Tras 24 horas, se determinó en los extractos celulares la actividad luciferasa. En presencia de la 3'UTR de E2F1 de tipo silvestre, la transfección con miR-32 conduce a una inhibición significativa del indicador de luciferasa cuando se lo comparó con el vector de control (P = 0,003, prueba t de dos colas). Esta inhibición se atenúa si la construcción indicadora contenía una secuencia diana 3'UTR de miR mutante.

**Figuras 4A-4B:** Análisis de expresión de DICER (**Fig. 4A**) y DGCR8 (**Fig. 4B**) por RT-PCR cuantitativa.

**Figuras 5A-5D:** Análisis de expresión de miR-32 (**Fig. 5A**), miR-106b (**Fig. 1B**), miR-106a (**Fig. 5C**) y miR-1 (**Fig. 5D**) por RT-PCR cuantitativa en tejido de próstata no tumoral (Normal) y tumores (Tumoral) procedentes de pacientes de cáncer de próstata. Se representan los valores relativos de la expresión de microARN para las muestras individuales y el valor medio para el conjunto de muestras. MiR-32, miR-106b y miR-106a se expresan de forma significativamente más elevada en el tejido tumoral que en el no tumoral: P = 0,037 (prueba t de dos colas) para miR-32; P = 0,009 (prueba t de dos colas) para miR-106b; P = 0,015 (prueba t de dos colas) para miR-106a.

**Figura 6:** La relación entre los niveles de transcrito de XPO6 y miR-1 en tumores de próstata.

**Figura 7:** miR-106b inhibe la actividad indicadora de luciferasa mediante un mecanismo mediado por la 3'UTR de *CDKN1A* (p21/WAF1).

**Figuras 8A-8B:** Inhibición significativa de la activación de caspasa-3/caspasa-7 por el grupo miR en células tratadas con fármaco antineoplásico.

**Figuras 9A 9B:** Los análisis por qRT-PCR de miR-338 y miR-221 maduros mostraron que su nivel de expresión está regulado por andrógenos.

**Figura 10:** Tabla 1: Características clínicas de la población de estudio.

**Figura 11:** Tabla 2: MicroARN expresados de forma diferencial entre tejido tumoral y no tumoral.

**Figura 12:** Tabla 3: MicroARN asociados a enfermedad extraprostática.

**Figura 13A:** Tabla 4A: Correlación inversa entre los niveles de transcrito de miR-1 y del gen diana en tumores de próstata.

**Figura 13B:** Tabla 4B: Predictor PAM de conjunto de 37 sondas para tumores de próstata.

**Figura 14:** Tabla 5: Genes diana de miR-181a que se correlacionan de forma negativa con miR-181a en tumores de próstata.

**Figura 15:** Tabla 6: microARN sensibles a andrógenos.

**Figura 16:** Tabla 7: Supuestos sitios de unión al receptor de andrógenos en la secuencia flanqueante de los

microARN.

**Figura 17-17B:** Análisis de conglomerados jerárquicos no supervisados de 57 tumores de próstata a base de la expresión de 235 microARN.

**Figura 17A:** La expresión de microARN produce dos grupos destacados con distintos perfiles de microARN. El grupo n.º 1 contenía todos los tumores no PNI (siglas del inglés: *perineural invasion*, invasión perineural).

**Figura 17B:** Distribución no aleatoria de tumores por el estado PNI entre los dos grupos ( $P = 0,002$ ; prueba exacta de Fisher de dos colas).

**Figura 18:** Análisis de grupo de Procesos Biológicos de la Ontología Génica que están enriquecidos para genes expresados de forma distinta comparando tumores PNI con tumores no PNI. Los resultados de un análisis de grupo se presentan en un mapa de calor con el rojo indicando un enriquecimiento de genes expresados de forma diferencial en un proceso biológico, por ejemplo, metabolismo de eicosanoides, para una comparación particular, por ejemplo, tumor PNI frente a tumor no PNI (“Invasión perineural”). El mapa de calor también muestra el análisis de grupo para la comparación de la puntuación de Gleason elevada (7-9) frente a la baja (5-6) (“puntuación suma de Gleason”), la comparación de pT3 frente a pT2 (“Fase patológica”) y la comparación de la extensión extraprostática positiva frente a la negativa (“Extensión extraprostática”). El análisis reveló que las diferencias en la expresión de genes no son aleatorias y crean patrones exclusivos de procesos biológicos afectados de forma frecuente para las cuatro comparaciones. El grupo agrandado muestra que los procesos biológicos que están enriquecidos de forma exclusiva para genes expresados de forma diferencial comparando tumores PNI con tumores no PNI. El metabolismo de eicosanoides, metabolismo de lípidos y la axonogénesis también están enriquecidos para genes expresados de forma diferencial comparando pT3 frente a pT2.

**Figuras 19A-19D:** Expresión de metalotioneína en tumores de próstata mediante inmunohistoquímica. El panel muestra ejemplos de expresión de metalotioneína en epitelio tumoral. Notoria expresión citoplasmática de metalotioneína en células cancerosas alejadas de neuronas (**Figura 19A**) y ausencia de esta expresión en células cancerosas perineurales (**Figura 19B**) en el mismo tumor. La expresión de metalotioneína disminuye a medida que las células tumorales se acercan al nervio (**Figuras 19C, 19D**). La flecha y “N” indican el emplazamiento de los troncos nerviosos teñidos de marrón. Contratinción: Verde de metilo.

**Figuras 20A-20D:** Expresión del receptor de adenovirus-coxsackie en tumores de próstata mediante inmunohistoquímica. Los paneles muestran ejemplos de la expresión del receptor en el epitelio tumoral. La tinción de membrana y citoplasmática para el receptor en células cancerosas alejadas de neuronas (**Figura 20A**) y en células cancerosas perineurales (**Figura 20B**) en el mismo tumor. La expresión del receptor de adenovirus-coxsackie disminuye en células cancerosas perineurales (**Figuras 20C, 20D**). N: tronco nervioso. Contratinción: Verde de metilo.

**Figuras 21A-21D:** *miR-224* en tumores de próstata por hibridación *in situ*. Se muestran ejemplos representativos de la expresión citoplasmática de *miR-224* en el epitelio tumoral. La tinción marrón granular muestra la presencia de *miR-224*. La mayoría de los tumores mostró un marcaje débil para *miR-224* (**Figura 21A**). En un subconjunto de tumores, se observó marcaje de *miR-224* moderado a fuerte en células cancerosas perineurales (**Figuras 21B-21C-21D**). N = tronco nervioso. Contratinción: Hematoxilina.

**Figura 22 - Tabla 8:** Características clínicas de la población de estudio de invasión perineural (PNI).

**Figura 23 - Tabla 9:** microARN regulados de forma positiva en tumores con PNI ( $FDR \leq 10\%$ ).

**Figura 24 - Tabla 10:** ARN que codifican proteínas con expresión diferencial entre tumores PNI y no PNI.

**Figura 25 - Tabla 11:** Validación de los resultados de la micromatriz mediante qRT-PCR para genes seleccionados.

**Figura 26 - Tabla 12:** Procesos biológicos más enriquecidos de forma significativa para genes expresados de forma distinta comparando tumores PNI con tumores no PNI.

## Descripción detallada de la invención

Antes de describir la presente invención con detalle, debe comprenderse que esta invención no se limita a formulaciones particulares o que los parámetros del proceso como tales pueden, por supuesto, variar. También debe comprenderse que la terminología utilizada en el presente documento es solo a fines de descripción de realizaciones particulares de la invención, y no se pretende que sea limitativa.

Aunque pueden utilizarse en la práctica de la presente invención varios métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen en el presente documento los materiales y métodos preferentes.

Los microARN son ARN no codificantes pequeños que regulan la expresión de genes que codifican proteínas. Para evaluar la implicación de los microARN en el cáncer de próstata, los inventores determinaron la expresión en todo el genoma de microARN y ARNm en 60 tumores de próstata primarios y 16 tejidos de próstata no tumorales.

La expresión de microARN se altera con el desarrollo y evolución del cáncer de próstata. Algunos de estos microARN regulan la expresión de genes relacionados con el cáncer en células de cáncer de próstata.

Como se utiliza en el presente documento de manera indistinta, un “producto de gen miR”, “microARN”, “miR” o “miARN” se refiere al transcrito de ARN sin procesar o procesado procedente de un gen miR.

Como se utiliza en el presente documento, "biomarcador" puede incluir uno o más de un "producto de gen miR", "microARN", "miR" o "miARN", o un ARN que codifica proteína.

5 La molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa puede obtenerse a partir del precursor de miR a través de vías de procesamiento naturales (por ejemplo, utilizando células intactas o lisados celulares) o mediante vías de procesamiento sintético (por ejemplo, utilizando enzimas de procesamiento aisladas, tales como Dicer, Argonaut o ARNasa III aisladas). Se comprende que la molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa puede también producirse de forma directa mediante síntesis biológica o química, sin tener que procesarse a partir del precursor de miR. Cuando un microARN se denomina en el presente documento por un nombre, el nombre corresponde tanto a la forma precursora como a la madura, a menos que se indique otra cosa.

15 La presente invención divulga métodos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno relacionado con la próstata. Como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" puede ser cualquier mamífero que tenga, o que se sospecha que tiene, cáncer de próstata.

20 El análisis de ARNm revela que los componentes clave del procesamiento de microARN y varios genes hospedadores de microARN, por ejemplo, MCM7 y C9orf5, estaban regulados de forma positiva significativamente en tumores de próstata. De manera consistente con estos hallazgos, los tumores expresaban el grupo miR-106b-25, que mapea en el intrón 13 de MCM7 y miR-32, que mapea el intrón 14 de C9orf5, a niveles significativamente más elevados que la próstata no tumoral.

Los niveles de expresión de otros microARN, incluyendo homólogos del grupo miR-106b-25 y el grupo miR-1-133a, también estaban alterados en los tumores de próstata.

25 Se encontraron diferencias adicionales en la abundancia de microARN entre tumores confinados al órgano y aquellos con extensión de enfermedad extraprostática.

30 Además, los inventores encontraron pruebas de que la desregulación de los microARN incide en la abundancia de transcrito de genes diana que codifican proteínas en la próstata.

En cultivo celular, E2F1 y p21/WAF1 se identificaron como dianas de miR-106b, Bim de miR-32, y exportina-6 y PTK9 de miR-1.

35 Los clasificadores basados en genes pueden ser herramientas de diagnóstico y pronóstico poderosas en la mejora del diagnóstico de enfermedades y para la predicción del comportamiento clínico. Los inventores utilizaron la aplicación PAM para identificar firmas de microARN que discriminen entre tejido tumoral y no tumoral. PAM identificó dos firmas de microARN que consisten en los conjuntos de 7 sondas y los conjuntos de 37 sondas que distinguieron mejor entre tejido tumoral y no tumoral (**Figura 13B - Tabla 4B**, en donde la firma del conjunto de 7 sondas se indica mediante \*).

40 El firma de conjunto de 7 sondas consiguió una clasificación correcta de 14 (el 88 %) de 16 tejidos no tumorales y 49 (el 82 %) de 60 tumores. Esta firma fue a base del patrón de expresión de solo cuatro microARN, miR-32, miR-218-2, miR-490 y miR-520h.

45 Se obtuvo mejora adicional de la precisión de la predicción total con firma de conjunto de 37 sondas que representaba a 23 microARN (Figura 11 [Tabla 5]). Esta firma solapaba de forma completa con la firma de conjunto de 7 sondas. Con la firma de conjunto de 37 sondas, PAM consiguió una clasificación correcta de 16 (del 100 %) de 16 tejidos no tumorales y 48 (el 80 %) de 60 tumores.

50 La presente invención se explica adicionalmente en los siguientes Ejemplos, en los que todas las partes y porcentajes son en peso y los grados son Celsius, a menos que se indique otra cosa. Debería comprenderse que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferentes de la invención, se proporcionan a modo de ilustración solamente. A partir de la discusión anterior y de estos Ejemplos, un experto en la materia puede determinar las características esenciales de la presente invención y, sin separarse del espíritu y el ámbito de la misma, puede hacer diversos cambios y modificaciones en la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

## **EJEMPLO I**

### *Muestras clínicas*

60 Se recibieron sesenta tumores de próstata congelados recientemente procedentes del NCI Cooperative Prostate Cancer Tissue Resource (CPICTR) y del Department of Pathology at the University of Maryland (UMD). Se obtuvo de todos los donantes el consentimiento escrito con total conocimiento de causa. Los tumores eran adenocarcinomas extirpados que no había recibido ninguna terapia antes de la prostatectomía. Un patólogo revisó las muestras de estudio tumorales macro-extirpadas, quien confirmó la presencia de tumor en las muestras de estudio congeladas. Se recogió tejido no tumoral de próstata circundante de 16 pacientes con cáncer de próstata.

Todos los tejidos se recogieron entre 2002 y 2004. La información sobre la raza/etnia se extrajo de registros médicos (CPCTR) o se obtuvo a través de un cuestionario epidemiológico (UMD). Las características clinicopatológicas de los pacientes, incluyendo la edad al momento de la prostatectomía, la histología, la puntuación de Gleason, la fase patológica, PSA en el momento del diagnóstico, tamaño tumoral, extensión extraprostática, implicación de los márgenes e invasión de la vesícula seminal se obtuvieron del CPCTR. Para los casos de la UMD, esta información se extrajo a partir de registros médicos y patológicos, si estaban disponibles. Los comités institucionales de revisión de las instituciones participantes aprobaron el estudio.

#### Extracción de ARN

Se aisló ARN total utilizando reactivo TRIZOL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La integridad del ARN de cada muestra se confirmó con el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Después, cada muestra de ARN se separó en dos alícuotas que se procesaron para la micromatriz de microARN o la micromatriz de ARNm.

#### Micromatrices de genes

Chip de oligonucleótidos de microARN por encargo. El marcaje y la hibridación de microARN se realizaron como se describió anteriormente. La micromatriz de microARN (Ohio State University Comprehensive Cancer Center, Versión 3.0) contiene sondas aplicadas puntualmente por cuadruplicado para 329 microARN de ser humano y 249 de ratón. Se puede encontrar más información sobre la plataforma de matriz en las bases de datos ArrayExpress y GEO, con los números de registro A-MEXP-620 y GSE8126, respectivamente.

#### Affymetrix GeneChip™

El marcaje y la hibridación de ARN se realizaron de acuerdo con los protocolos convencionales de Affymetrix (Santa Clara, CA). Brevemente, 5 µg de ARN total se sometieron a transcripción inversa con un cebador oligo (dT) que tiene un promotor de la ARN polimerasa T7 en el extremo 5'. La síntesis de la segunda cadena estuvo seguida de la producción de ARNc con la incorporación de ribonucleótidos biotinilados utilizando el Kit BioArray High Yield RNA Transcript Labeling T3 de Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY). El ARNc marcado se fragmentó e hibridó con las matrices Affymetrix GeneChip HG-U133A 2.0. Esta matriz contiene conjuntos de 22.283 sondas que representan aproximadamente 13.000 genes que codifican proteínas humanas. Las señales de hibridación se visualizaron con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (Invitrogen) y se detectaron utilizando un GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). En conformidad con las directrices de la Información Mínima Sobre un Experimento con Micromatriz (MIAME, siglas en inglés de: *Minimum Information About a Microarray Experiment*), los inventores depositaron los archivos CEL para los datos de micromatrices y la información adicional de los pacientes en el depósito GEO ([ncbi.nlm.nih.gov/aeol/](http://ncbi.nlm.nih.gov/aeol/)). Los números de registro del envío GEO para los datos de caracterización de microARN y ARNm son GSE8126 y GSE6956, respectivamente.

#### Normalización de los datos y análisis estadísticos de las micromatrices

Los chips de Affymetrix se normalizaron utilizando el procedimiento de análisis de multichip robusto (AMR). Se utilizó normalización centrada en la media para los chips de oligonucleótidos de microARN por encargo. Para generar listados sobre genes expresados de forma distinta, el conjunto de datos resultante se sometió al procedimiento de análisis de significación de micromatriz (ASM). Los inventores generaron listados de genes a base de ambos valores P de las pruebas t de dos colas y las tasas de descubrimientos falsos previstos (FDR, siglas de inglés: *false discovery rate*). El cálculo de la FDR siguió el método descrito por Storey y Tibshirani. Para clasificar los tejidos en categorías previstas, por ejemplo tejido tumoral o no tumoral, se utilizó el análisis de predicción para micromatrices (PAM: siglas del inglés *prediction analysis for microarrays*) (25). En este análisis, el umbral delta se eligió a base de la mejor compensación para las tasas de errores de entrenamiento y las tasas de errores del coeficiente de variación (CV). La validación cruzada se realizó dejando fuera el 10 % de las muestras para determinar el parámetro de umbral apropiado en el PAM.

#### Predicción de dianas de microARN

Los inventores utilizaron TargetScanS (<http://genes.mit.edu/tscan/taraetscanS.html>) para la predicción de dianas de microARN. Solo se consideraron en el análisis de los inventores los sitios de unión predichos para microARN que se emplazan dentro de la 3'UTR y están conservados entre especies. Para el análisis y extracción de datos, los datos se formatearon en la base de datos WholePathwayScope. Para identificar los microARN que regulan la abundancia de transcrito de sus ARNm diana en tejido de próstata humana, se realizó un análisis de correlación. Para esto, se computó el coeficiente de correlación de Pearson. La significación estadística del coeficiente de correlación de Pearson se determinó mediante una prueba t de dos colas.

#### PCR cuantitativa en tiempo real

La abundancia de microARN maduros se midió utilizando el kit TaqMan® MicroRNA Assays de tallo-bucle (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con un protocolo publicado. Brevemente, se sometió ADNc a transcripción inversa a partir de 10 ng de ARN total con cebadores específicos para microARN del kit TaqMan® MicroRNA Assay y los reactivos el kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó PCR en tiempo real sobre ADNc con Applied Biosystems Tagman 2X Universal PCR Master Mix y el 5X TaqMan® MicroRNA Assay Mix apropiado para cada microARN de interés. Se incubaron reacciones por triplicado en un sistema de PCR en Tiempo Real Applied Biosystems 7500 en una placa de 96 pocillos durante 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Se calculó para cada muestra el ciclo umbral (CO mediante el programa informático ABI 7500 Sequence Detection System). Se utilizaron curvas patrón para determinar en las muestras las concentraciones de microARN, que se normalizaron después con respecto al ARN U6.

#### *Regulación de la expresión de proteínas mediante los microARN*

Se crecieron células de cáncer de próstata humano LNCaP y PC3 (ATCC, Manassas, VA) hasta el 50 % de confluencia y se transfectaron con precursor de microARN o inhibidor de microARN antisentido (ambos de Ambion, Austin, TX) a una concentración final de 100 nM utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Tras 48 horas, las células se recogieron mediante raspado y las proteínas se extrajeron con tampón RIPA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Para determinar la concentración de proteínas se realizó el ensayo de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, CA: n.º 500-0006) y para el análisis por transferencia de Western se cargaron en un gel 50 µg de proteína. Se utilizaron los siguientes precursores de microARN: control negativo de pre-microARN (AM17110); hsa-miR-1 (n.º cat. AM17100 ID del producto: PM10617); hsa-miR-32 (n.º cat. AM17100 ID del producto: PM12584) y hsa-miR-106b (n.º cat. AM17100 ID del producto: PM10067). Se utilizaron los siguientes inhibidores de microARN (antisentido): control negativo de anti microARN (AM17010); hsa-miR-1 (n.º cat. AM17100 ID del producto: AM10617); hsa-miR-32 (n.º cat. AM17000 ID del producto: AM12584) y hsa-miR-106b (n.º cat. AM17000 ID del producto: AM10067). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios para visualizar la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia de Western: anticuerpo policlonal de conejo anti exportina-6, 1:200 (ProteinTech Group, Chicago, IL: 11408-1-AP); anticuerpo monoclonal de ratón anti PTK9, 1:500 (Abnova Corp., Taipei, Taiwán: clon 1E2); anticuerpo monoclonal de ratón anti E2F1, 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA: sc-251); anticuerpo monoclonal de ratón anti p21/WAF, 1:200 (Santa Cruz Biotechnology: sc-6246) y anticuerpo policlonal de conejo anti BIM, 1:1000 (Cell Signaling/Santa Cruz Biotechnology: n.º 2819). Se obtuvo una cuantificación de la expresión de proteínas con AIDA Biopackage, 2D-Densitometry (raytest Isotopenmessgeraete GmbH Straubenhardt, Alemania).

#### *Ensayos de luciferasa de una construcción indicadora que contiene la 3'UTR de E2F1 y BCL2L11*

Las 3'UTR de E2F1 y BCL2L11 (que codifica Bim) conteniendo la secuencia diana predicha de miR-106b y miR-32, respectivamente, se amplificaron a partir de ADN genómico (células 293T) y se clonaron en el vector control pGL3 luciferasa de libélula (Promega, Madison, WI) en el sitio de restricción XbaI, inmediatamente cadena abajo del gen indicador de la Luciferasa. Para generar las 3'UTR con una secuencia diana mutante, se insertó una delección de los primeros 3 nucleótidos en los sitios complementarios de la regiones semilla de miR-106b y miR-32, utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA). Se ensayó en células LNCaP la inhibición traduccional del gen informador de la luciferasa por parte de miR-106b o miR-32. Brevemente, se sembraron en placas de 24 pocillos 1,2x10<sup>5</sup> células LNCaP por pocillo. Al día siguiente, las células se transfectaron con 500 ng de plásmido informador, 2 ng de informador Renilla y ya sea control negativo de microARN o microARN precursor a una concentración final de 100 nM, utilizando el reactivo lipofectamina 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las transfecciones se realizaron por triplicado. Las células se transfectaron con ya sea el control negativo de pre-microARN (AM17110), hsa-miR-106b (n.º cat. AM17100 ID de producto: PM10067) o el precursor hsa-miR-32 (n.º cat. AM17100 ID de producto: PM12584). Tras 24 horas, las células se lisaron de acuerdo con un protocolo convencional de Promega, y se determinó la actividad relativa de la luciferasa utilizando un luminómetro DYNEX Technologies MLX. La actividad del indicador se normalizó con respecto a la concentración de proteína en los extractos celulares.

#### *Tratamiento de células de cáncer de próstata con un agonista del receptor de andrógenos*

Se sembraron en matraces de 75 cm<sup>2</sup> células de cáncer de próstata humano DU-145 (1x10<sup>6</sup>) y LNCaP (2x10<sup>6</sup>) (ATCC) y se cultivaron con RPMI 1640 complementado con PBS al 10 %, estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 unidades/ml y anfotericina B 0,25 µg/ml durante 24 horas. Posteriormente, las células se colocaron en RPMI 1640 sin rojo fenol con PBS tratado con carbón recubierto con dextrano al 5 % (Invitrogen) durante 48 horas para el empobrecimiento de hormonas. Después, las células se trataron con ya sea R1881 (metiltienolona, PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA) 10 nM o disolvente (etanol). Tras 24 horas, las células se recogieron y se aisló el ARN total utilizando el kit mirVana PARIS (Ambion, Inc.). Este experimento se repitió cinco veces. El marcaje y la hibridación de microARN se realizaron como se describió anteriormente (21), y la expresión global de los microARN se determinó en la micromatriz del Ohio State University Comprehensive Cancer Center (Versión 4.0).

RESULTADOS del EJEMPLO I

*Regulación positiva de Dicer en tumores de próstata*

5 Se recogieron tumores de próstata procedentes de pacientes afroamericanos y euroamericanos con enfermedad localizada (**Figura 10 - Tabla 1**).

10 Después el aislamiento del ARN total a partir de estos tumores y a partir de 16 tejidos no tumorales, se determinó con micromatrices la expresión de aproximadamente 13.000 genes que codifican proteínas y 329 microARN humanos exclusivos.

15 De forma inicial, los perfiles de expresión de genes de estas muestras se analizaron para alteraciones relacionadas con cáncer de la expresión de los ARNm que habían mostrado que regulaban el procesamiento de los microARN, por ejemplo, los ARNm que codifican Drosha o Dicer, entre otros. El análisis de los inventores reveló que Dicer se expresa de forma significativamente elevada en los tumores de próstata (1,6 veces, FDR < 1 %) cuando se comparó con tejido no tumoral. DGCR8, que codifica un cofactor esencial para Drosha, también estaba regulado de forma positiva en tumores pero en un grado menor (1,2 veces; FDR < 1 %) que Dicer cuando se comparó con tejido no tumoral. DGCR8, que codifica un cofactor esencial para Drosha, también estaba regulado de forma positiva en tumores (1,2 veces, FDR < 1 %). La expresión aumentada de *Dicer* y *DGCR8* en tumores se confirmó mediante qRT-PCR, lo que reveló una diferencia en veces más grande que la indicada por la micromatriz (**Figuras 4A-4B**).

20 Los análisis adicionales mostraron que Dicer y EIF2C2, ambos componentes del complejo RISC, estaban expresadas de forma más elevada en tumores con una puntuación suma de Gleason elevada (puntuación 7-9) que en tumores con una puntuación suma de Gleason baja (puntuación 5-6). Sin embargo, estas diferencias de expresión eran más bien modestas (Dicer: 1,2 veces; EIF2C2: 1,3 veces). Debido a que se ha encontrado en células humanas una frecuente coexpresión de genes hospedadores y de microARN intrónicos, los inventores también investigaron la expresión de genes hospedadores de microARN en tumores de próstata.

30 Entre los genes hospedadores para los microARN, se encontró que la expresión de cinco (todos FDR < 1 %) estaba alterada en el cáncer de próstata. De ellos, *C9orf5* (regulación positiva de 2,1 veces), que es el hospedador para miR-32, y *MCM7* (regulación positiva de 1,7 veces), que es el hospedador para el grupo miR-25 (miR-25/miR-93/miR-106b), fueron los que tenían la expresión aumentada más elevada en tumores. *NFYC* (hospedador de miR-30c-1), *SMC4L1* (hospedador de miR-15b y miR-16-2) y *PTPRN2* (hospedador de miR-143-2) mostraron una expresión aumentada más moderada del 30 % al 40 % en tumores, cuando se comparó con tejido no tumoral.

35 *Firma genética de microARN para el cáncer de próstata*

40 En primer lugar los inventores buscaron los microARN que mostraban expresión diferencial entre tejido tumoral y no tumoral. Como se muestra en la **Figura 11 - Tabla 2**, la expresión de múltiples microARN se alteró en los tumores de próstata.

45 Entre los microARN con menores niveles de transcripción en tejidos tumorales que en tejidos no tumorales, miR-520h, miR-494 y miR-490 fueron los que disminuyeron de forma más elevada. Otros dos microARN notables en este listado fueron miR-1(-2) y miR-133a(-1). Estos dos microARN están codificados por el mismo pri-ARNm. miR-32 fue el microARN tumoral regulado de forma positiva más significativamente, seguido de miR-182, miR-31 y miR-26a. El listado de los microARN tumorales expresados de forma más elevada también contenía a todos los miembros del grupo miR-106b-25 (miR-106b/miR-93/miR-25) y dos miembros del grupo miR-99b, miR-99b y miR-125a. La regulación positiva de miR-32 y el grupo miR-106b-25 es consistente con la expresión aumentada de sus respectivos genes hospedadores, *C9orf5* y *MCM7*, en tumores de próstata.

50 Un análisis estadístico de los datos de micromatriz confirmó que los niveles de transcrito en tejido de *C9orf5* y miR-32 estaban significativamente correlacionados de forma estadística (P = 0,0003). El coeficiente de Pearson indicó que esta correlación era moderadamente fuerte a través de todas las muestras (0,39; intervalo de confianza del 95 %: 0,18 a 0,57; n = 76). Se obtuvieron datos similares para la correlación entre los niveles de transcrito de *MCM7* y el grupo *miR-106b-25* (*miR-106b*: 0,37 (coeficiente de Pearson), P = 0,001; *miR-93*: 0,35, P = 0,002; *miR-25*: 0,23, P = 0,04).

60 Los inventores corroboraron los datos de micromatriz mediante análisis de qRT-PCR de microARN seleccionados en un subconjunto aleatorio de tejidos tumorales y no tumorales. De forma consistente con las micromatrices, los inventores encontraron que miR-32 (3,2 veces) y miR-106b (3,0 veces) maduros están expresados de forma más elevada en tejidos tumorales que en no tumorales (**Figuras 5A-5D**). Los inventores también encontraron que *miR-1* maduro estaba regulado de forma negativa (promedio: 0,44 veces) y que *miR-106a*, un homólogo de *miR-106b*, tenía una expresión aumentada (promedio: 3,7 veces) en los tumores cuando se comparó con tejidos no tumorales.

65 Los inventores también realizaron un análisis pareado de los datos de micromatriz para los 10 tumores del estudio para los que estaba disponible tejido no tumoral circundante. El análisis pareado corroboró los hallazgos previos de

los inventores. A una FDR <10 %, miR-26a, miR-30c-1, miR-32, miR-146b, miR-181a, miR-182, miR-196a, miR-200c, miR-375 y todos los microARN del grupo miR-106b-25 se encontró que estaban regulados de forma positiva en los tumores (1,5 veces a 2,5 veces). El microARN tumoral regulado de forma negativa más significativamente fue miR-494 (0,4 veces) y miR-126 (0,6 veces). Sin embargo, el grupo miR-133a no se encontró que se expresase significativamente de forma distinta en este subconjunto de tumores.

#### *Asociación de los microARN con extensión extraprostática y la puntuación de Gleason*

A continuación, los inventores analizaron el conjunto de datos para diferencias en la expresión de microARN asociadas a la extensión extraprostática de los tumores. La extensión extraprostática es un factor de pronóstico no favorable en pacientes con carcinoma de próstata. A una FDR < 10 %, los inventores encontraron 15 microARN con una diferencia en la expresión entre tumores que mostraron una extensión extraprostática de la enfermedad (n = 17) y los que no lo hicieron (n = 35) (**Figura 12 - Tabla 3**).

miR-101 fue el microARN con expresión aumentada de forma más consistente en tumores de próstata localizados que se propagan fuera de la glándula prostática (FDR < 1 %). La extensión extraprostática compartía una parte de su firma de microARN con la firma de tumor (**Figura 11 - Tabla 2**).

Dos microARN, miR-99b y miR-196a, son comunes a ambas firmas. Otros dos microARN de la firma de extensión extraprostática, miR-200a y miR-200b, tienen una homología extensa con miR-200c en la firma de tumor. Los inventores también estudiaron la asociación a los microARN con la invasión de la vesícula seminal, aunque en el estudio se diagnosticaron pocos tumores con esta característica. Solo un microARN se expresó de forma distinta entre los tumores con invasión de vesícula seminal (n = 9) y aquellos sin invasión (n = 43) a una FDR < 20 %. Este microARN era miR-199a-1, y estaba aumentado 2,3 veces en tumores con invasión de la vesícula seminal cuando se comparó con los otros tumores.

La caracterización de la expresión de microARN no reveló una firma robusta para la puntuación de Gleason. Se encontró que solamente muy pocos microARN estaban expresados de forma distinta a una FDR <20 %. Los microARN regulados de forma positiva significativamente (P < 0,01) en tumores con una puntuación suma de Gleason elevada (puntuación 7-9, n = 45) fueron miR-92-2 (1,3 veces), un homólogo de miR-25 y miR-32, y miR-335 (1,2 veces), y los microARN regulados de forma negativa de forma significativa (P < 0,01) eran el grupo miR-1-133a (0,7 veces) y miR-130 (0,8 veces), cuando se comparó con tumores que tienen una puntuación suma de Gleason baja (puntuación 5-6, n = 15).

Debido a que en el estudio de los inventores los tumores se recogieron de pacientes afroamericanos y euroamericanos que se ajustaban bien a los parámetros clinicopatológicos (**Figura 10 - Tabla 1**), los inventores compararon las firmas de microARN de tumor entre afroamericanos (n = 30) y euroamericanos (n = 30). Pocos microARN estaban expresados de forma distinta (P < 0,01). A una FDR < 20 %, se encontró que miR129, miR-196b y miR-342 eran menos abundantes (del 20 % al 30 % menor) en tumores de afroamericanos que en tumores de euroamericanos. A partir de este análisis, no parece que los microARN tumorales estén expresados de forma muy distinta por raza/etnia.

#### *Clasificación de tejido tumoral y no tumoral con los microARN*

Los clasificadores basados en genes son herramientas de diagnóstico y pronóstico potentes para la mejora del diagnóstico de enfermedades y para la predicción del comportamiento clínico. Los inventores utilizaron la aplicación PAM para identificar firmas de microARN que discriminen entre el tejido tumoral y no tumoral, entre tumores confinados a órgano y tumores con extensión extraprostática y entre tumores con puntuación suma de Gleason elevada y baja. PAM identificó las dos firmas de microARN que consisten en conjuntos de 7 sondas y conjuntos de 37 sondas que mejor distinguen entre tejido tumoral y no tumoral. La firma de conjuntos de 7 sondas consiguió una clasificación correcta de 14 (el 88 %) de 16 tejidos no tumorales y 49 (el 82 %) de 60 tumores. Esta firma estaba basada en el patrón de expresión de solo cuatro microARN, miR-32, miR-218-2, miR-490 y miR-520h (**Figura 13B - Tabla 4B**), todas las cuales estaban entre los microARN tumorales regulados de forma positiva o negativa más significativamente (**Figura 11 - Tabla 2**). Se obtuvo una mejora adicional de la precisión de predicción completa con una firma de conjunto de 37 sondas que representaba a 23 microARN (**Figura 14 - Tabla 5**).

Esta firma solapó de forma completa con la firma del conjunto de 7 sondas. Con la firma del conjunto de 37 sondas, PAM consiguió una clasificación correcta de 16 (el 100 %) de 16 tejidos no tumorales y 48 (el 80 %) de 60 tumores. PAM no pudo identificar buenos clasificadores para extensión extraprostática y puntuación de Gleason. Un clasificador débil a modesto de puntuación de Gleason necesita conjuntos de 149 sondas (datos no mostrados).

#### *Relación entre la abundancia de transcrito de los microARN y sus ARNm diana en tejido de próstata*

Los microARN regulan la expresión de genes que codifican proteínas mediante la inhibición traduccional específica de la diana. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que algunos microARN, por ejemplo, miR-1, pueden regular de forma negativa los niveles de transcrito de un gran número de genes diana en células de mamífero.

Debido a que miR-1 estaba entre los microARN regulados de forma negativa de forma más significativa en tumores de próstata, los inventores realizaron un análisis de correlación entre los niveles de expresión de miR-1 y los niveles de expresión de los genes diana de miR-1 predichos en estos tumores. Esta prueba se realizó para identificar genes diana de miR-1 candidatos que debido a la expresión reducida de miR-1 se vuelven de expresión aumentada en tumores de próstata. El análisis produjo supuestos ARNm diana que se encontró que estaban regulados de forma positiva en tumores de próstata (FDR < 1 %) y que correlacionaron de forma inversa con la expresión de miR-1 (**Figura 13 - Tabla 4**).

Entre ellos, los transcritos para WDR6, XPO6 y SMARCA4 mostraron la correlación inversa más significativa con la expresión de miR-1 tumoral (cada  $P < 1 \times 10^{-10}$ ). La relación entre los niveles de transcrito de XPO6 y miR-1 en tumores de próstata se representa en la **Figura 6**.

Los inventores también encontraron que los niveles de proteína XPO6 en los tumores se correlacionaron de forma inversa con miR-1 (coeficiente de correlación de Spearman -0,29; n = 8). Sin embargo, no todas las dianas predichas de miR-1 mostraron una relación inversa con los niveles de transcrito de miR-1 en los tumores. Por ejemplo, TWF1 (también denominado PTK9) se correlacionó de forma positiva con miR-1, sugiriendo que la unión de los microARN a su secuencia diana algunas veces puede conducir al secuestro de ARNm y a la acumulación celular del ARNm inhibido (30).

Los análisis de los inventores se extendieron a otros microARN que estaban regulados de forma positiva o negativa de forma significativa en tumores de próstata. Aquí, los inventores determinaron de forma inicial que la distribución global de los coeficientes de correlación de Pearson entre el microARN de interés y ya sea todos los ARNm que se sondaron mediante la matriz HG-U133A 2.0 o solo los ARNm que son dianas predichas de los microARN. Para dos microARN, miR-106b y miR-181a, la distribución de los coeficientes de correlación fue notablemente distinta entre todos los ARNm y los ARNm que son dianas predichas de miR-106b y miR-181a (**Figuras 1A-1B**).

Las curvas de distribución para los ARNm diana predichos de miR-106b y miR-181a, mostraron un saliente distinto que se extendía hacia los coeficientes de correlación de Pearson negativos. Este patrón es una desviación de una distribución normal e indica que los niveles de transcrito de tejido de un subconjunto de ARNm, que tienen una secuencia diana de microARN predicha en la 3'UTR, están reducidos por miR-106b y miR-181a. En la **Figura 14 - Tabla 5** se muestra un listado de genes diana que estaban regulados de forma negativa de forma significativa en tumores (FDR < 1 %) y cuyo nivel de transcrito correlacionó de forma inversa con la expresión de miR-181a.

Una comparación de estos genes diana con un listado de genes que correlacionaron con los niveles de transcrito de miR-181a en muestras de leucemia (31) mostró que varios, por ejemplo, SLC9A6, RIN2, KLHL2 y GHITM, estaban correlacionados de forma negativa con miR-181a en ambos listados.

*Inhibición de la expresión de proteínas mediante oncomiR candidatos en células de cáncer de próstata*

Los resultados de los inventores a partir de los estudios de tumores sugieren que miR-1, miR-32 y el grupo miR-106b-25 son oncomiR en cáncer de próstata, miR-32 y miR-25 comparten un alto grado de homología y sus genes diana predichos son los mismos (targetscan.org). Además, el grupo miR-106b-25 es altamente homólogo a un oncomiR conocido, el grupo miR-17-92 y las dianas predichas de miR-17-5p y miR-106b son idénticas. Una diana del grupo miR-17-92 es E2F1.

Los inventores transfectaron dos líneas celulares de cáncer de próstata humano con microARN precursores y antisentido, para examinar si miR-1, miR-32 y miR-106b regulan la expresión de proteínas de genes relacionados con el cáncer en estas células.

La expresión endógena de estos microARN en las líneas celulares fue miR-106 > miR-32 > miR-1 mediante qRT-PCR. miR-1 fue el límite de detección. Para miR-1, los inventores analizaron si la relación entre la abundancia de transcrito de los microARN y sus ARNm diana en tejido tumoral es útil para identificar dianas de microARN y examinaron si la expresión de proteínas de exportina-6 (XPO6) y de la proteína tirosina quinasa 9 (TWF1) está regulada por miR-1. La transfección de las células de cáncer de próstata con miR-1 confirmó que este reprime tanto a exportina-6 como a PTK9 en el nivel de proteína en ambas líneas celulares de cáncer de próstata (**Figura 2A**). Ni miR-32 ni miR-106b alteraron la expresión de estas proteínas (datos no mostrados).

A continuación, los inventores investigaron la regulación de los niveles de proteínas de E2F1 y P21/WAF1 mediante miR-106b. Ambas proteínas están codificadas en ARNm que tienen una secuencia diana predicha de miR-106b en sus 3'UTR. Mientras que E2F1 no correlaciona con miR-106b a nivel de transcrito en tumores de próstata, existe en estos tumores una correlación inversa significativa entre la expresión de CDKN1A (codifica p21/WAF1) y miR-106b (-0,34; IC del 95 %; -0,9 hasta -0,55; P = 0,003).

Como se muestra en la **Figura 2B**, el precursor miR-106b transfectado disminuyó los niveles de proteína p21/WAF1 y el miR-106b antisentido aumentó los niveles de proteína p21/WAF1 en las dos líneas celulares. Los inventores obtuvieron los mismos resultados para E2F1 tras la transfección de las células de cáncer de próstata con miR-106



precursor y antisentido (**Figura 3A**).

Los inventores también estudiaron el efecto de miR-32 sobre la expresión de proteína Bim. Bim está codificada en BCL2L11 y es una diana predicha de miR-32. La transfección de células de cáncer de próstata con el precursor miR-32 disminuyó los niveles de proteína Bim mientras que miR-32 antisentido aumentó los niveles de proteína Bim (**Figura 3C**). Bim está codificado en BCL2L11 y es una diana predicha de miR-32. BCL2L11 y los niveles de transcrito de miR-32 no correlacionaron en las muestras de tejido, sugirieron que miR-32 puede regular su diana mayoritariamente mediante inhibición de la traducción.

La expresión de proteínas de E2F1 y p21/WAF1 no estaba influenciada por miR-32, ni estaba influenciada por miR-106b la expresión de proteínas de Bim en estas líneas celulares (datos no mostrados).

*E2F1 y Bim son dianas directas de miR-106b y miR-32*

Para corroborar adicionalmente los hallazgos de los inventores y para proporcionar pruebas de que estas proteínas son dianas directas de miR-106b y miR-32, se cotransfectaron células LNCaP con microARN precursor y construcciones pGL3 luciferasa indicadoras que contenían ya sea la 3'UTR de tipo silvestre o mutante de dos genes, E2F1 y BCL2L11 (que codifica Bim), respectivamente. Las 3'UTR mutantes contenían una delección de los 3 primeros nucleótidos en los sitios complementarios de la región semilla de miR-106b y miR-32. Las 3'UTR se colocaron en una posición que conduciría a una inhibición traduccional del indicador luciferasa cuando el microARN se une a la secuencia diana.

Como se muestra en la **Figura 3B** y la **Figura 3D**, la cotransfección con ya sea miR-106b con la construcción indicadora que contiene las 3'UTR del tipo silvestre de E2F1 o miR-32 con la construcción indicadora que contiene las 3'UTR de tipo silvestre de BCL2L11, dio como resultado una inhibición significativa de los indicadores de luciferasa cuando se comparó con el control negativo del microARN precursor. No existió inhibición del indicador por los microARN en ausencia de la 3'UTR. La presencia de un 3'UTR mutante suprimió o atenuó el efecto de los microARN. Los resultados son consistentes con un efecto directo de los microARN sobre la traducción de proteínas mediante la unión a sus secuencias dianas 3'UTR. Tal mecanismo también se ha establecido para la regulación de p21/WAF1 mediante miR-106b en células de cáncer de colon y gástrico humanas. Por consiguiente, los inventores observaron que miR-106b inhibe un indicador luciferasa mediante un mecanismo mediado por la 3'UTR de CDKN1A en células LNCaP (**Figura 7**).

*Inhibición de la activación de la caspasa mediante el grupo miR-106b-25 en células de cáncer próstata humano 22Rv1*

Los datos anteriores de los inventores indicaron que miR-32, miR-106b y sus homólogos (por ejemplo, miR-25) pueden actuar como oncogenes, debido a que se dirigen a la función proapoptótica de Bim y E2F1. Para evaluar el efecto del grupo miR-106b-25 sobre la apoptosis inducida mediante doxorubicina y etopósido, los inventores infectaron células 22Rv1, una línea celular de cáncer de próstata no metastásica, con una construcción de expresión lentivírica que codifica el grupo miR-106b-25. Utilizando el ensayo de apoptosis de Caspase-Glo, los inventores observaron una inhibición significativa de la activación de caspasa-3/caspasa-7 mediante este grupo en células tratadas con fármaco antineoplásico (**Figuras 8A-8B**). Los datos son consistentes con una función antiapoptótica del grupo miR-106b-25 en células de cáncer de próstata.

*Identificación de microARN regulados por andrógenos*

Los andrógenos desempeñan un papel clave en la fisiología y la biología tumoral de la próstata. Los inventores examinaron la regulación de los microARN por andrógenos en células DU145 y LNCaP. El tratamiento de las células DU145 con R1881 no produjo ningún cambio significativo en la expresión de microARN. Por el contrario, la expresión de numerosos microARN cambió de forma significativa (FDR < 5 %) en células LNCaP después del tratamiento con R1881 (**Figura 15 - Tabla 6**).

Un microARN, miR-338, estaba regulado de forma positiva significativamente. Los otros microARN estaban regulados de forma negativa, incluyendo miR-126-5, miR-146b, miR-219-5p y todos los miembros de los grupos miR181b-1, miR-181c y miR-221. Un análisis de la medida inicial de la expresión de microARN en células DU145 y LNCaP cultivadas, reveló que todos los miembros de los tres grupos de microARN presentaron una expresión significativamente más elevada en las células DU145 insensibles a andrógenos que en las células LNCaP sensibles a andrógenos (FDR < 5 %).

Utilizando una búsqueda de motivos en la base de datos de sitios de unión a factores de transcripción Genomatrix, los inventores encontraron que los anteriormente mencionados microARN tienen supuestos sitios de unión a receptor de andrógeno en sus regiones flanqueantes (**Figura 16 - Tabla 7**). Adicionalmente, los inventores corroboraron los resultados de micromatriz en experimentos con células LNCaP que se habían tratado con R1881 ya sea 1 o 10 nmol/l durante 12, 24 y 48 horas. Los análisis por qRT-PCR de los miR-338 y miR-221 maduros mostraron que su nivel de expresión está regulado por andrógenos (**Figuras 9A-9B**).

DISCUSIÓN DEL EJEMPLO I

- Los inventores han descubierto ahora una firma de expresión de microARN de tumores de próstata distinta y modificaciones en la expresión de genes que regulan el procesamiento de microARN tumoral. Además, los inventores encontraron pruebas de que la desregulación de los microARN incide en la abundancia de transcrito y la expresión de proteínas de los ARNm diana en la próstata. En cultivo celular, los inventores demostraron que los oncomiR candidatos en cáncer de próstata, por ejemplo, miR-32 y miR-106b, inhiben la expresión de proteínas de genes relacionados con el cáncer. Los resultados son consistentes con un papel patógeno de la expresión alterada de microARN en la carcinogénesis de próstata humana.
- Este es el primer estudio que utiliza la caracterización de la expresión de genes a gran escala tanto para los microARN como para los ARN que codifican proteínas, para identificar alteraciones en la función de microARN que se produce en los tumores próstata humanos. Otros puntos fuertes del estudio son su gran tamaño de muestra y la inclusión de pacientes afroamericanos y euroamericanos. Por lo tanto, los hallazgos son representativos para los dos grupos de raza/étnicos que tienen la mayor carga de cáncer de próstata en los Estados Unidos.
- Los inventores encontraron un aumento de la expresión de Dicer y DGCR8 en tumores de próstata, y de Dicer y EIF2C2, que codifica argonauta-2, en tumores con una puntuación de Gleason elevada. La observación de que Dicer está regulada de forma positiva en el cáncer de próstata es consistente con un informe reciente e indica que los tumores de próstata podrían ser más eficaces que el tejido de próstata normal en el procesamiento de precursores de microARN a microARN maduro. Se ha observado recientemente que el procesamiento afectado de microARN potencia la oncogenia en ratones, y otras han hipotetizado que el procesamiento de microARN en general está regulado de forma negativa en el cáncer.
- En tumores de próstata, sin embargo, puede tener lugar el efecto opuesto del procesamiento de microARN potenciado, como se refleja en los datos de los inventores y el estudio anteriormente mencionado que muestra expresión de proteínas aumentada de Dicer en células de cáncer de próstata y expresión aumentada de Dicer y EIF2C2 en la enfermedad metastásica.
- Los perfiles de expresión de microARN clasifican a los cánceres humanos. Se han comunicado distintas firmas para varios cánceres epiteliales, incluyendo cáncer de mama, colon, pulmón y de páncreas. Otros dos estudios cribaron la expresión de microARN en el cáncer de próstata. De forma consistente con los datos de próstata de Baylor, los inventores observaron también que miR-145 está regulado de forma negativa significativamente en tumores de próstata. Sin embargo, estos dos estudios publicados fueron más bien pequeños y examinaron solo algunos tumores en comparación con el estudio de los inventores.
- Los inventores identificaron una firma génica tumoral que contiene microARN regulados de forma positiva y negativa.
- El microARN regulado de forma positiva más forma mas elevada fue mir-32, seguido de miR-182, miR-31, miR-26a, miR-200c y miR-196a. El listado de los microARN tumorales con expresión aumentada también contenía al grupo miR-106b-25, lo que es consistente con la ganancia observada en el número de copias para miR-25, miR-93 y miR-106b en varios cánceres humanos.
- Los microARN regulados de forma negativa de forma más significativa incluyeron a miR-520h, miR-494, miR-490 y el grupo miR-1-133a.
- La expresión alterada de los microARN en el cáncer humano se ha observado en numerosos estudios. La regulación positiva de los microARN en tumores es común, y es consistente con la actividad oncogénica conocida de muchos microARN. Los mecanismos de regulación positiva incluyen activación transcripcional y el aumento del número de copias de genes. Una disminución de la abundancia de microARN maduro puede ser el resultado de un procesamiento alterado, como se ha demostrado recientemente, lo que podría conducir a una expresión menor indiscriminada de los microARN maduros. Los inventores no observaron eso en el presente estudio. Como alternativa, la expresión de microARN podría perderse debido a mutaciones o modificaciones genómicas (21) o al silenciamiento epigenético de los locus de microARN. El silenciamiento epigenético es un mecanismo importante en el cáncer de próstata y futuros estudios tendrán que abordar si este mecanismo impide la expresión de microARN en tumores de próstata.
- Se sabe poco acerca de la función de la mayoría de estos microARN. miR-32 es un homólogo de miR-25, miR-92, miR-363 y miR-367. Varios de estos microARN estaban también regulados de forma positiva en los tumores de próstata. miR-32 está aumentado en cáncer de colon y de páncreas, y es un mediador de la defensa antivírica de las células humanas. Esta función de miR-32 podría ser un vínculo entre su expresión alterada y el desarrollo de cáncer de próstata, debido a que varios de los genes conocidos de susceptibilidad al cáncer de próstata también están implicados en la defensa del hospedador. Como se muestra para otros microARN, miR-32 debería regular la expresión de proteínas de genes diana.

Los inventores hicieron la nueva observación de que miR-32 inhibe la expresión de Bim, un miembro pro apoptótico de la familia BCL-2. Bim es haploinsuficiente y la inactivación de un alelo es suficiente para acelerar la oncogenia inducida por Myc. Bim tiene papeles claves en la apoptosis de tumores epiteliales y media los efectos antineoplásicos de la quimioterapia. Por lo tanto, la regulación negativa de Bim mediante miR-32 puede contribuir a la resistencia de las células tumorales a los estímulos apoptóticos en el entorno tumoral.

Otros microARN notables con una función conocida incluyen miR-1, miR-133a y miR-196a. El grupo miR-1-133a se expresa de forma preferente en células musculares y se ha demostrado que regula la diferenciación celular. miR-1 es un homólogo de miR-206, que es un supresor de la metástasis en el cáncer de mama. El descubrimiento de los inventores de que miR-1 está regulado de forma negativa en tumores de próstata concuerda con la función supresora tumoral de su homólogo.

Los inventores examinaron a miR-1 y observaron que la expresión de este microARN está correlacionada de forma inversa con la expresión de exportina-6 y la proteína tirosina quinasa 9 (también denominada A6/twinfilina) en tumores de próstata y en células de cáncer de próstata cultivadas. No se sabe mucho acerca de la función de estos dos genes, pero datos recientes sugieren que ambos regulan la dinámica de la actina celular. miR-196a se identificó como un represor de HOXB8, y la expresión elevada de miR-196a predice una mala supervivencia en el cáncer de páncreas. En el estudio de los inventores este microARN era común para la firma tumoral y la firma de extensión extraprostática, lo que indica que la regulación positiva de miR-196a en el cáncer de próstata podría ser un factor en la evolución de la enfermedad.

Se ha demostrado que las firmas de microARN tienen valor diagnóstico y pronóstico en el cáncer humano.

Los inventores determinaron el significado diagnóstico y pronóstico de la expresión de microARN en el cáncer de próstata investigando la asociación de los microARN con el diagnóstico tumoral, la extensión extraprostática, la puntuación de Gleason y la raza/etnia de los pacientes. Se comparó la firma de microARN tumoral de pacientes afroamericanos y euroamericanos debido a que aparecieron pruebas recientes de que podrían existir diferencias en la biología tumoral entre estos dos grupos de pacientes. Aunque se encontraron grandes diferencias en la expresión de microARN entre el tejido tumoral y no tumoral en la próstata, relativamente pocos microARN estaban expresados de forma distinta entre los tumores que se propagaban fuera de la glándula prostática y los que no lo hacen, entre tumores que tienen una puntuación de Gleason > 7 y los que tienen una puntuación < 7, y entre tumores procedentes de pacientes afroamericanos y pacientes euroamericanos.

Además, se identificó mediante PAM un conjunto de siete (7) sondas que consiste en cuatro (4) microARN que podría distinguir entre tejido de próstata tumoral y no tumoral. Sin embargo, el análisis de PAM podría no generar un buen clasificador para la extensión extraprostática, la puntuación de Gleason, o la raza/etnia.

Los inventores identificaron un microARN, miR-101, que estaba asociado a la extensión de enfermedad extraprostática con un margen bajo de error. La función de este microARN es desconocida. Los inventores creen que la heterogeneidad intrínseca de los tumores de próstata les impide hallar más microARN que estén asociados a factores de pronóstico desfavorable en el cáncer de próstata.

El análisis del emplazamiento genómico de los microARN puede proporcionar pistas acerca de su supuesta función y de los mecanismos que provocan la expresión alterada de microARN en tumores. Estudios recientes han demostrado que los microARN con frecuencia se emplazan en intrones de genes que codifican proteínas y se coexpresan con estos genes hospedadores. Los inventores investigaron la expresión de genes hospedadores en tumores de próstata y encontraron que varios de ellos estaban aumentados en los tumores de próstata. C9orf5 y MCM7 fueron los dos genes hospedadores regulados de forma positiva de forma más elevada y su expresión correlacionó con la expresión de los microARN intrónicos, miR-32 y el grupo miR-106b-25, respectivamente. Los datos sugieren un mecanismo común que conduce a la regulación positiva del gen hospedador y del microARN cotranscrito en tumores de próstata.

Aunque el papel de C9orf5 en el cáncer es desconocido, las amplificaciones de MCM7 se han asociado anteriormente al cáncer de próstata. Se ha encontrado que el locus MCM7 está amplificado en el 88 % de los casos con recaída del cáncer. La expresión aumentada de MCM7 no está restringida al cáncer de próstata y se ha observado en otros cánceres, incluyendo cáncer de cuello uterino.

Los inventores examinaron si miR-106b se dirige a E2F1 y CDKN1A (que codifica p21/WAF1) en células de cáncer de próstata y encontraron que la expresión de proteínas de estos genes está inhibida mediante miR-106b. El grupo miR-106b-25 tiene extensa homología con otros dos grupos de microARN que son oncogenes humanos candidatos, el grupo miR-17-92 y el grupo miR-106a-363. E2F1 también es una diana de miR-17-5p y miR-20a en el grupo miR-17-92, y tiene función tanto de oncogén como de supresor tumoral. Como Bim, E2F1 traducido es proapoptótico y coopera con el supresor tumoral p53 para mediar la apoptosis. Su expresión aumentada induce a apoptosis en células LNCaP, lo que indica que, en el entorno tumoral, la inhibición de la traducción de E2F1 mediante miR-106b puede proteger a las células de cáncer de próstata de la apoptosis.

p21/WAF1 es un mediador de la supresión tumoral por p53. Se ha demostrado el efecto inhibitor del crecimiento de p21/WAF1 en el cáncer de próstata, y esta media la detención del ciclo celular en células de carcinoma de próstata en respuesta a agentes antineoplásicos. Los inventores analizaron si el grupo miR-106b-25 tiene actividad antiapoptótica y encontraron que en células 22Rv1a inhibe activación de la caspasa mediante doxorubicina y etopósido.

Estos datos concuerdan con una función oncogénica de miR-106b en el cáncer de próstata, debido en parte a su capacidad para suprimir la expresión de proteínas de E2F1 y p21/WAF1.

Ni miR-1, ni miR-32, ni el grupo miR-106b-25 estuvieron regulados por la estimulación de andrógenos de células LNCaP. Sin embargo, los inventores identificaron varios otros microARN que estaban regulados de forma positiva o negativa mediante el tratamiento con andrógenos. Estos incluyeron a miR-338 y miR-126, y los grupos miR-181b-1, miR-181c, miR-221, entre otros. Una búsqueda de motivos mostró que estos microARN tienen en sus regiones flanqueantes supuestos sitios de unión al receptor de andrógenos.

miR-338 fue el único microARN regulado de forma positiva significativamente. No hay informes sobre la función de este microARN, pero se emplaza en una región con frecuentes ganancias de número de copias en tres cánceres epiteliales.

Los miembros de la familia miR-181 inciden en la diferenciación del linaje hematopoyético, y su expresión está alterada en la leucemia y varios tumores sólidos. Se ha encontrado que los grupos miR-221 regulan al supresor tumoral p27<sup>Kip1</sup> y pueden tener propiedades oncogénicas en el cáncer de próstata. Sin embargo, este grupo también inhibe al oncogén c-Kit y la angiogénesis.

La identificación de los genes que codifican proteínas que están regulados mediante un microARN se ha probado difícil a pesar de desarrollo de estrategias computacionales para predecir dianas de microARN. La capacidad para encontrar ARNm dianas se complica además por el hecho de que la selectividad de diana de los microARN puede depender del entorno celular.

Los inventores utilizaron una estrategia exploratoria y realizaron un análisis de correlación entre la expresión de microARN y la expresión de ARNm en tejido de próstata. Aunque sin desear ligarse a una teoría, en el presente documento los inventores creen ahora que esta estrategia será exitosa si el microARN de interés afecta la abundancia de transcrito de los ARNm diana, pero fallará si los genes diana están regulados solo mediante inhibición traduccional.

Los inventores encontraron que la expresión de miR-1 está correlacionada de forma inversa con varios genes diana predichos de forma computacional en tumores de próstata, por ejemplo, XPO6. Sin embargo, los inventores también encontraron que la expresión tumoral de miR-1 correlaciona de forma positiva con el nivel de transcrito de dianas predichas, por ejemplo, PTK9. La validación posterior de estas observaciones en cultivo celular confirmó que tanto XPO6 como PTK9 están regulados por miR-1 en células de cáncer de próstata.

Los datos proporcionan nueva evidencia de que la unión de los microARN a las secuencias 3'UTR puede conducir tanto a la degradación como a la acumulación en células de mamífero de los ARNm diana que tienen como objetivo, y que tanto una correlación inversa como una positiva entre un microARN y un ARNm en un tejido humano pueden ser predictivas de un gen diana de microARN. Por lo tanto, el análisis de correlación de la expresión de microARN y ARNm en tejido humano puede resultar útil en la identificación de los ARNm que están regulados por los microARN.

Los inventores han identificado ahora alteraciones en la expresión de microARN que se producen en tumores de próstata humanos y que correlacionan con las variaciones de la expresión de genes que codifican proteínas en estos tejidos. Los experimentos en cultivo celular mostraron que los microARN tumorales pueden regular la expresión de los genes relacionados con el cáncer en células de cáncer de próstata humanas. Estos resultados muestran un papel patógeno de los microARN en la biología del cáncer de próstata.

## EJEMPLO II

### *Introducción*

El cáncer de próstata es el cáncer diagnosticado con más frecuencia y la segunda causa más común de mortalidad por cáncer entre los hombres norteamericanos. La mortalidad puede atribuirse a la propagación de células cancerosas más allá de la próstata. La invasión perineural (PNI) es la ruta dominante para la invasión local en el cáncer de próstata y también es un mecanismo para la propagación extraprostática de la enfermedad. No obstante, el significado pronóstico de la PNI sigue siendo controvertido. Varios estudios han observado una asociación de la PNI con marcadores con malos resultados, pero otros no encontraron que sea un factor pronóstico del cáncer de próstata.

La aparición de la PNI es un acontecimiento relativamente temprano en el desarrollo de la enfermedad clínica, y la mayoría de las muestras de estudio tumorales procedentes de prostatectomía radical son positivas para PNI. Es esta elevada tasa de aparición de la PNI en muestras clínicas (el 85 % al 100 %) y el conocimiento inadecuado de su biología lo que limita la comprensión sobre el papel de las PNI en la evolución del cáncer de próstata y en los resultados de la enfermedad.

La PNI es el proceso en donde las células cancerosas se adhieren a y envuelven nervios. Esto se produce en muchos otros tipos de cáncer, incluyendo los cánceres de páncreas y de cabeza y cuello. Las células del cáncer de próstata que tienen un emplazamiento perineural adquieren una ventaja en la supervivencia y crecimiento y presentan apoptosis reducida y proliferación aumentada, en comparación con células emplazadas lejos de los nervios. Se ha observado en la PNI expresión alterada de moléculas de adhesión en células de cáncer de próstata y en los nervios adyacentes, y se ha hipotetizado que la expresión modificada de estas moléculas permite a las células cancerosas desarrollarse en la vecindad de los nervios.

15 Sin embargo, todavía se entienden mal los mecanismos moleculares que conducen a la PNI.

En el EJEMPLO II, los inventores aplicaron la caracterización de la expresión de genes de los microARN y de los genes que codifican proteínas para identificar los cambios de la expresión de genes asociados a la PNI en el cáncer de próstata humano. Los inventores investigaron si la firma de expresión génica que diferencia a los tumores PNI de los no PNI revelará las alteraciones moleculares que tienen lugar en la transición desde un tumor no invasivo a un tumor con PNI. Los inventores ensayaron los microARN debido a que se ha demostrado su papel crucial en el cáncer. Se ha demostrado que sus perfiles de expresión clasifican tumores según el linaje del desarrollo y el estado de diferenciación.

## 25 MATERIALES Y MÉTODOS PARA EL EJEMPLO II

### *Muestras de tejido.*

Se obtuvieron del NCI Cooperative Prostate Cancer Tissue Resource (CPCTR) muestras de estudio de tumores congelados. Los tumores eran adenocarcinomas extirpados que no habían recibido ninguna terapia antes de la prostatectomía. Un patólogo revisó las muestras de estudio tumorales macroextirpadas, quien confirmó la presencia de tumor en las muestras de estudio congeladas. Todos los tejidos se recogieron entre 2002 y 2004. Los comités de revisión institucional de las instituciones participantes aprobaron la recolección de tejido.

### 35 *Extracción de ARN.*

Se aisló ARN total utilizando el reactivo TRIZOL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se confirmó la integridad del ARN para cada muestra con el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Después, cada muestra de ARN se dividió en dos alícuotas que se procesaron para la micromatriz de microARN o para la micromatriz de ARNm.

### *Micromatrices de genes.*

El marcaje y la hibridación de microARN se realizaron como se describió anteriormente. La micromatriz de microARN (Ohio State University Comprehensive Cancer Center, Versión 2.0) contiene sondas aplicadas de forma puntual por cuadruplicado para 235 microARN de ser humano y 222 de ratón [24]. El marcaje y la hibridación de los ARNm se realizaron de acuerdo con los protocolos convencionales de Affymetrix (Santa Clara, CA). Brevemente, se sometieron a transcripción inversa 5 µg de ARN total con un cebador oligo (dT) que tiene el promotor de la ARN polimerasa T7 en el extremo 5'. La síntesis de la segunda cadena estuvo seguida de la producción de ARNc con la incorporación de ribonucleótidos biotinilados utilizando el kit BioArray High Yield RNA Transcript Labeling T3 de Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY). El ARNc marcado se fragmentó e hibridó con las matrices Affymetrix GeneChip HG-U133A 2.0. Esta matriz contiene 22.283 conjuntos de sondas que representan aproximadamente 13.000 genes que codifican proteína humanos. Las señales de hibridación se visualizaron con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (Invitrogen) y se examinaron utilizando el escáner GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). En conformidad con las directrices de la Información Mínima Sobre Experimentos de Micromatriz (MIAME), los inventores depositaron los archivos CEL para los datos de micromatriz y la información adicional de los pacientes en el archivo GEO ([ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/)). El número de registro de envío GEO para los datos de caracterización de microARN y ARNm es GSE7055. La información adicional sobre la micromatriz de microARN por encargo, Versión 2.0, puede encontrarse con el número de registro de ArrayExpress: A-MEXP-258.

### 60 *Datos de normalización y análisis estadísticos*

Para los chips de oligonucleótidos de microARN por encargo se utilizó normalización centrada en la media. Los chips de Affymetrix se normalizaron utilizando el procedimiento de análisis robusto de multichips (ARM). Para generar listados de genes expresados de forma significativamente distinta, el conjunto de datos resultante se sometió al procedimiento de análisis de significación de micromatrices (ASM). Los inventores generaron listados de

genes a base de ambos valores P, procedentes de las pruebas t de dos colas y de las tasas de descubrimiento falso previstas (FDR). El cálculo de la FDR siguió el método descrito por Storey y Tibshirani. La agrupación jerárquica no supervisado se realizó de acuerdo con los principios descritos por Eisen *et al.*

##### 5 *Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real de microARN y ARNm.*

La abundancia de los microARN maduros se midió utilizando el kit TaqMan® MicroRNA Assays de tallo-bucle (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con un protocolo publicado [29]. Utilizando 10 ng de ARN total, se sometió a transcripción inversa microARN maduro a ADNc extendido en el 5' con cebadores de TI en horquilla  
 10 específicos para microARN procedentes del kit TaqMan® MicroRNA Assays y los reactivos procedentes del kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real se realizó sobre el ADNc con la Applied Biosystems TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix y la 5X TaqMan® MicroRNA Assays Mix apropiada para cada microARN de interés. Se incubaron las reacciones por triplicado en un sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR en una placa de 96 pocillos durante 10 min a  
 15 95 °C, seguido de 40 ciclos durante 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Se calculó para cada muestra el ciclo umbral (*C<sub>t</sub>*) mediante el programa informático ABI 7500 Sequence Detection System. Se utilizaron curvas patrón para determinar en las muestras las concentraciones de microARN, lo que después se normalizó con respecto a ARN U6. La abundancia del ARNm se determinó de acuerdo con un método descrito anteriormente de PCR en tiempo real cuantitativa (qRT) [30]. Por consiguiente, se sometieron a transcripción inversa 100 ng del ARN total utilizando el kit  
 20 High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City, CA). Posteriormente se realizó la qRT-PCR por triplicado, utilizando TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems), que incluye conjuntos de sondas y cebadores preoptimizados específicos para los genes a validar. Los números ID de los ensayos de los genes validados son como sigue: Hs00744661\_sH para la metalotioneína 1F y Hs00828387\_g1 para la metalotioneína 1M. Los datos se recogieron utilizando el sistema ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System. El ARN 18s se utilizó  
 25 como la referencia estándar interna. La expresión normalizada se calculó utilizando el método comparativo *C<sub>t</sub>* como se ha descrito y los cambios en veces se obtuvieron de los valores  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para cada gen.

##### *Inmunohistoquímica.*

Se evaluó de forma inmunohistoquímica la expresión de proteínas en células cancerosas perineurales y no perineurales en cortes de tumores fijados en formalina, incluidos en parafina. Los tumores (n = 30) procedían de próstatas de pacientes tratados mediante prostatectomía radical en el Baltimore VA Hospital y el University of Maryland Medical Center. Para visualizar zonas con PNI se tiñeron de forma inmunohistoquímica cortes de cinco micrómetros para S100, un marcador de troncos nerviosos. Se encontró que secciones procedentes de catorce  
 35 tumores contenían zonas representativas con células cancerosas perineurales y no perineurales. Para la recuperación de antígeno, se trataron con microondas cortes desparafinados en tampón Citra 1x (Biogenex, San Ramon, CA). Se realizó tinción inmunohistoquímica con el sistema Dako Envision (DakoCytomation, Carpinteria, CA). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal de conejo para S100 diluido 1:500 (Ventana, Tucson, AR); anticuerpo monoclonal de ratón para receptor de adenovirus y coxsackie (CX- CXADR) (Atlas Antibodies, Estocolmo, Suecia) diluido 1:1000 y anticuerpo monoclonal de ratón para la metalotioneína (DakoCytomation) diluido 1:500. Este anticuerpo (E9) reconoce miembros de la familia de la metalotioneína-1 y -2 (n.º M0639). Controles positivos: intestino (CXADR) e hígado (metalotioneína). La omisión del anticuerpo primario fue el control negativo. Un patólogo, que desconocía los resultados de la micromatriz, evaluó la intensidad de las  
 45 inmunotinciones en células cancerosas perineurales y no perineurales y categorizó la inmunotinción como menos intensa, la misma, o más intensa en las células cancerosas perineurales cuando se las comparó con las células cancerosas no perineurales. Se tomaron imágenes de zonas representativas para documentar las diferencias en la expresión.

##### *Hibridación in situ.*

La hibridación *in situ* (HIS) se realizó utilizando el sistema GenPoint™ Catalyzed Signal Amplification System (DakoCytomation) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, se incubaron portaobjetos a 60 °C durante 30 minutos y se desparafinaron como se describe. Los cortes se trataron con Proteinasa K (DakoCytomation) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con H<sub>2</sub>O varias veces y se sumergieron en etanol al 95 % durante  
 55 10 segundos antes de secarlas al aire. Los portaobjetos se prehibridaron a 54 °C durante 1 hora con tampón de hibridación *in situ* (Enzo Life Sciences, Inc. Farmingdale, NY) antes de una incubación durante una noche a 54 °C en tampón que contenía ya sea sonda de detección miRCURY™ LNA de *miR-224* marcada con biotina en el 5' (Exiqon, Woburn, MA) o sonda de control negativo desorganizada (Exiqon) a la concentración final de 50 nM. Los portaobjetos se lavaron en TBST y solución de lavado riguroso GenPoint™ (54 °C durante 30 minutos). Después, los portaobjetos se expusieron a solución de bloqueo de N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DakoCytomation) durante 20 minutos y se bloquearon adicionalmente en un tampón de bloqueo (DakoCytomation, X0909) durante 30 minutos antes de exponerlas al anticuerpo Estreptavidina-HRP primario, biotilil tiramida, anticuerpo Estreptavidina-HRP secundario, y soluciones del cromógeno de DAB siguiendo el protocolo del fabricante. Después, los portaobjetos se contratiñeron brevemente en hematoxilina y se aclararon con TBST y agua antes de montarlos. Un patólogo evaluó la intensidad de la HIS de  
 65 *miR-224* en células cancerosas perineurales y no perineurales utilizando el mismo criterio que se utilizó para la

inmunohistoquímica.

*Análisis de ruta.*

5 Este análisis se realizó con el programa informático interno WPS. Las rutas se anotaron de acuerdo con los  
 Procesos Biológicos de la Ontología Génica (GOBP, siglas en inglés *Gene Ontology Biological Processes*) (Gene  
 Ontology Consortium: geneontology.org). La base de datos de los inventores tenía 16.762 genes humanos anotados  
 para los GOBP. Los genes se incluyeron en el análisis de ruta a base de la FDR ( $\leq 30\%$ ) de sus conjuntos de  
 10 sondas correspondientes en la micromatriz. Si varios conjuntos de sondas codificaban el mismo gen, el programa  
 informático reconocía esto y aseguraba que el gen se contaba solo una vez para la prueba de significación en el  
 nivel de ruta. Se utilizó la prueba exacta de Fisher de una cola para determinar qué procesos biológicos tenían un  
 enriquecimiento estadísticamente significativo de genes expresados de forma distinta ( $P < 0,05$ ). Los inventores  
 15 compilaron los resultados de la prueba exacta de Fisher para análisis de grupos y presentaron los resultados en  
 mapas de calor con códigos en color para revelar los patrones de los procesos biológicos alterados de forma  
 significativa. El código de color de los mapas de calor se refiere al enriquecimiento de genes en un proceso biológico  
 (a base de  $-\log$  (valor  $P$ )), con el rojo indicando un mayor enriquecimiento.

RESULTADOS PARA EL EJEMPLO II

20 *Muestras clínicas y análisis de expresión génica.*

Los inventores recogieron muestras de estudios de tumores macroextirpados procedentes de prostatectomías  
 radicales de 57 pacientes con cáncer de próstata (**Figura 22 - Tabla 8**). Siete (el 12 %) de los tumores fueron  
 negativos para la PNI. De forma consistente con la bibliografía, estos tumores tenían un tamaño más pequeño y una  
 25 puntuación de Gleason más pequeña que los tumores PNI positivos. Además, todos los tumores PNI negativos  
 estaban confinados a la próstata. Los inventores investigaron las diferencias de la expresión génica entre los  
 tumores con PNI y los que eran negativos para PNI. Los perfiles de expresión génica procedentes de estos tumores  
 se generaron utilizando una micromatriz de microARN por encargo que representa 235 microARN humanos y la  
 matriz Affymetrix Gene-Chip HG-U133A 2.0, que representa aproximadamente 13.000 genes que codifican proteínas  
 30 humanas.

En un análisis inicial del conjunto de datos de los inventores, los inventores aplicaron agrupamiento jerárquico no  
 supervisado para examinar si podía distinguirse la expresión de los microARN y los ARNm entre tumores con PNI y  
 aquellos sin PNI. El agrupamiento jerárquico a base de la expresión global de ARNm no separó los casos de PNI de  
 35 los casos no PNI (datos no mostrados). Sin embargo, los patrones de expresión de los microARN en estas muestras  
 produjo dos grupos destacados con distintos perfiles de microARN (**Figuras 17A-17B**). El grupo n.º 1 contenía todos  
 los tumores no PNI y un subgrupo de tumores con PNI. El grupo n.º 2 contenía los tumores PNI para los que era  
 significativamente más probable que tuvieran una puntuación de Gleason elevada ( $\geq 7$ ) y una extensión de la  
 enfermedad extraprostática que los tumores en el grupo n.º 1 ( $P < 0,05$ , respectivamente; prueba exacta de Fisher  
 40 de dos colas).

El análisis de la significación de los datos de micromatriz reveló que 19 microARN y 34 genes que codifican proteína  
 estaban expresados de forma significativamente distinta entre los tumores PNI y los no PNI a una FDR  $\leq 10\%$ . En  
 este umbral, todos los microARN estaban regulados de forma positiva en los tumores PNI (**Figura 23 - Tabla 9**),  
 45 mientras todos los ARNm tenían una expresión menor en tumores PNI que en tumores no PNI (**Figura 24 - Tabla  
 10**).

Este listado de microARN expresados de forma distinta fue exclusivo para la comparación entre tumores PNI y no  
 PNI en el conjunto de datos de los inventores. Ninguno de estos microARN estaban expresados de forma  
 50 significativamente distinta por ya sea el grado o la fase tumoral (FDR  $< 30\%$ ). De forma opuesta a la comparación  
 PNI con respecto a no PNI, solo muy pocos microARN se expresaban de forma significativamente distinta entre  
 puntuación de Gleason elevada (puntuación suma 7-9) y baja (puntuación suma 5-6), por ejemplo miR-1 estaba  
 regulado de forma negativa en tumores con puntuación de Gleason elevada, y entre los confinados en órgano y  
 aquellos con extensión extraprostática. Entre los genes que codifican proteínas que se expresaban de forma distinta  
 55 entre los tumores PNI y no PNI, muchos codifican ya sea metalotioneínas (metalotioneína 1F, 1G, 1H, 1M, 1X, 2A) o  
 proteínas con emplazamiento mitocondrial (4-aminobutirato aminotransferasa, ferroquelatasa, acil-coenzima A  
 deshidrogenasa de cadena larga, proteínas ribosómicas mitocondriales L39/S1). También estaba regulado de forma  
 positiva un subconjunto de estos genes en tumores con una puntuación de Gleason elevada cuando se comparó con  
 tumores de puntuación de Gleason baja (**Figuras 19A-19D**). No hubo solapamiento con genes que se expresan de  
 60 forma distinta según la fase tumoral.

*Validación de los datos de micromatriz mediante qRT-PCR.*

Para la validación mediante qRT-PCR se eligieron cinco microARN y dos ARNm (**Figura 25 - Tabla 11**). De forma  
 65 consistente con los datos de micromatriz, los inventores encontraron una expresión significativamente más elevada  
 de miR-224, miR-10, miR-125b, miR-30c y miR-100 maduros en tumores PNI cuando se comparó con tumores no

PNI. Los niveles de transcrito de las metalotioneínas 1M y 1F fueron significativamente inferiores en los tumores PNI cuando se comparó con los tumores no PNI, lo que también es consistente con los datos de micromatriz de los inventores.

5 *Asociación de rutas de genes que codifican proteínas que se expresan de forma distinta según el estado PNI.*

Los inventores realizaron un análisis de ruta basándose en los genes anotados en el GOBP (n = 62) cuyo ARNm se expresó de forma distinta entre tumores PNI y no PNI a una FDR  $\leq$  30 %. El análisis reveló varios procesos biológicos que estaban enriquecidos para genes expresados de forma distinta comparando tumores PNI con tumores no PNI. Los procesos biológicos alterados de forma más significativa incluían el transporte y metabolismo de ácidos orgánicos (carboxílico)/ácidos grasos, aminoácidos y (poli)aminas (**Figura 26 - Tabla 12**). Ellos también incluyeron el proceso biológico de “neurogénesis”, lo que concuerda con la interacción conocida entre las células tumorales y los nervios en la PNI.

15 Se realizó un análisis de grupo para identificar procesos biológicos que están enriquecidos para genes expresados de forma distinta según el estado de PNI del tumor (positivo para PNI frente a negativo para PNI), pero no según puntuación de Gleason (puntuación de Gleason elevada frente a baja), fase patológica (pT3 frente a pT2) o según la presencia de extensión extraprostática (sí frente a no). Como se muestra mediante un mapa de calor, el análisis identificó varios procesos biológicos que estaban enriquecidos de forma exclusiva para genes expresados de forma distinta al comparar tumores PNI positivos con PNI negativos (**Figura 18**). Estos procesos biológicos incluían el metabolismo y transporte de ácidos orgánicos (carboxílico)/ácidos grasos, aminoácidos y (poli)aminas, como se describió anteriormente, pero también procesos relacionados con la regulación negativa de la muerte celular programada.

25 *Expresión de metalotioneína, de receptor de adenovirus y coxsackie y de miR-224, en células cancerosas perineurales.*

Aunque los análisis basados en micromatrices de los inventores indicaron que los tumores PNI y no PNI diferían en su patrón de expresión génica, esta estrategia no es informativa con respecto a la expresión de estos genes en células cancerosas perineurales y no perineurales. Los inventores utilizaron inmunohistoquímica e hibridación *in situ* para investigar la expresión relativa de dos genes que codifican proteínas, la metalotioneína (metalotioneína-1 y -2) y el receptor de adenovirus y coxsackie (CXADR), y de *miR-224* en células cancerosas perineurales y no perineurales. La inmunohistoquímica se realizó en cortes de 14 tumores que contenían zonas representativas para células cancerosas perineurales y no perineurales. Se realizó hibridación *in situ* sobre secciones de 11 tumores.

35 Se encontró que la metalotioneína, CXADR y *miR-224* se expresaban en el epitelio tumoral (**Figuras 19A-19D, Figuras 20A-20D y Figuras 21A-21D**). El patrón de marcaje para la metalotioneína (epitelial, citoplasmático, nuclear) y CXADR (epitelial, en membrana, citoplasmático) fue consistente con el descrito por otros. Se observó una expresión más baja de la metalotioneína y de CXADR en células cancerosas perineurales de 6 tumores (el 43 %) y 7 tumores (el 50 %), respectivamente, cuando se comparó con células cancerosas no perineurales en los mismos tejidos (**Figuras 19A-19D, Figuras 20A-20D**). No se detectó diferencia en los otros tumores con la excepción de uno (el 7 %) en donde la expresión de la metalotioneína se puntuó como más elevada en células cancerosas perineurales que en células cancerosas no perineurales. Se observó en 4 tumores (el 36 %) una notoria expresión aumentada de *miR-224* en células cancerosas perineurales (**Figuras 21A-21D**). No se observó tal diferencia en los otros 7 tumores, en donde la expresión de *miR-224* fue mayoritariamente baja a no detectable en el epitelio tumoral.

DISCUSIÓN DEL EJEMPLO II

Los inventores investigaron los perfiles de expresión génica de tumores PNI y no PNI y encontraron entre ellos diferencias significativas en la expresión de microARN y de ARNm. Muy sorprendentemente, el análisis de conglomerados jerárquicos no supervisados a base de la expresión de 235 microARN produjo dos grupos de tumores principales, uno de los cuales contenía todos los tumores no PNI. Los inventores no consiguieron tal clasificación a base de la expresión de 13.000 transcritos que codifican proteínas, lo cual está de acuerdo con otros estudios que no pudieron encontrar una firma de expresión de ARNm asociada a la invasión local en el cáncer de próstata.

Los hallazgos de los inventores demuestran que la expresión de microARN podría ser una característica más distintiva de los tumores PNI, cuando se compara con tumores no PNI, que la expresión de ARNm. Estos hallazgos son consistentes con informes anteriores que muestran que los perfiles de expresión de microARN pueden ser superiores a los perfiles de expresión de ARNm en la clasificación de tumores por linaje del desarrollo y estado de diferenciación.

Se encontró que diecinueve microARN se expresaban de forma más elevada en tumores PNI que en tumores no PNI. De ellos, miR-10, miR-21 y miR-125b son oncogenes candidatos. Además, miR-21 y miR-224 se emplazan en regiones cromosómicas asociadas a cáncer que se encontró que tienen una expresión génica aumentada en el cáncer de próstata humano. Se ha descrito una firma de expresión de microARN común a varios cánceres sólidos



humanos, incluyendo cáncer de próstata. Los microARN compartidos entre ese estudio y el estudio de firma de PNI de los inventores son miR-21, miR-24 y miR-30c. Más notable es, sin embargo, el solapamiento de la firma de PNI con otras firmas de microARN que se descubrieron en condiciones experimentales.

5 Se encontró que la hipoxia induce miR-24, miR-26, miR-27 y miR-181. Estos microARN también están regulados de forma positiva en tumores PNI. Aún más destacables son las similitudes entre la firma de PNI y una firma de microARN inducida por inflamación en pulmones de ratones tratados con LPS. Aquí, LPS indujo a miR-21, miR-27b, miR-100 y miR-224, entre varios otros microARN. Por lo tanto, la firma de microARN de PNI observada podría ser en parte el resultado de un entorno proinflamatorio y de hipoxia en la próstata cancerosa.

10 Para evaluar la posibilidad de efectos confusos por grado y fase tumoral en la firma de PNI, los inventores compararon el listado de microARN expresados de forma distinta entre tumores PNI y no PNI con los mismos listados comparando tumores con puntuación de Gleason elevada con baja y tumores confinados al órgano con tumores que mostraban extensión extraprostática. Este análisis adicional reveló que la firma de PNI no estaba compartida por estos dos contrastes. En cambio, se encontraron solo muy pocos microARN que se expresaban de forma significativamente distinta por grado y fase tumoral. La naturaleza heterogénea de los tumores de próstata pudo haber limitado la capacidad de los inventores para encontrar una firma de microARN asociada a estos dos factores pronósticos. Como alternativa, la firma de PNI podría ser muy distinta y exclusiva para la transición de no PNI a PNI y podría implicar de forma específica la interacción entre células nerviosas y cancerosas. Esta firma podría también ser un fenómeno transitorio de células las cancerosas y desaparecer cuando estas células se diseminan a partir de su emplazamiento perineural. Los inventores analizaron la expresión de miR-224, el microARN expresado de forma más distinta según el estado PNI, en células cancerosas perineurales y no perineurales y encontraron en un subconjunto de los tumores una expresión aumentada de este en células cancerosas perineurales. Aunque no todos los tumores mostraron regulación positiva de miR-224 en células cancerosas perineurales, la observación indica que los mecanismos mediante los que las células cancerosas se adhieren a los nervios podrían estar implicados en la inducción de miR-224.

15 El análisis del perfil de expresión de ARNm reveló 34 genes que estaban regulados de forma negativa en tumores PNI a un umbral de FDR de  $\leq 10\%$ . A pesar de que los inventores observaron genes que estaban expresados de forma más elevada en tumores PNI que en tumores no PNI, por ejemplo, *CRISP3*, *PSCA*, *BMP7* o *BCL2*, su FDR elevada los excluyó del listado de los inventores de genes expresados de forma significativamente distinta. Solo otros dos estudios, utilizando un modelo de cocultivo de células de cáncer de próstata DU-145 con células neuronales, examinaron el perfil de expresión de ARNm asociado a la PNI. Los estudios descubrieron que los genes que codifican *bystina* y *Pim-2* están regulados de forma positiva en la PNI. Los inventores no detectaron un aumento de los ARNm correspondientes en tumores PNI. Las distintas metodologías podrían explicar algunas de las diferencias entre los listados de genes generados en los diversos estudios. Además, el chip de los inventores no contenía conjuntos de sondas para el gen que codifica la *bystina*.

20 Varios de los 34 genes expresados de forma distinta eran miembros de la familia de genes de la metalotioneína. Estos genes están emplazados en un grupo génico en el cromosoma 16q13 y se ha encontrado que en el cáncer de próstata están regulados de forma negativa por la hipermetilación del promotor y la disponibilidad de cinc reducida. Mediante inmunohistoquímica, los inventores pudieron confirmar que en un subconjunto de tumores de próstata la expresión de la metalotioneína es notablemente más baja en células cancerosas perineurales cuando se las compara con células cancerosas no perineurales. La regulación negativa en la transición desde un tumor no PNI a un tumor PNI puede indicar cambios importantes en el metabolismo de los metales de las células cancerosas que tienen lugar en esta fase de la enfermedad. Varios otros genes en el listado de genes expresados de forma distinta de los inventores, codifican proteínas con emplazamiento mitocondrial, por ejemplo, 4-aminobutirato aminotransferasa, ferroquelatasa y acil-coenzima A deshidrogenasa de cadena larga, entre otros. La aminobutirato aminotransferasa y la acil-coenzima A deshidrogenasa de cadena larga son genes clave en el metabolismo del ácido orgánico (carboxílico) (por ejemplo, cuerpos cetónicos, ácidos grasos) de las células, mientras que la ferroquelatasa está implicada en la biosíntesis del grupo hemo. Las alteraciones en el metabolismo y en el genoma de la mitocondria son acontecimientos comunes en la carcinogénesis de próstata. Los datos de los inventores muestran que algunos de estos cambios pueden producirse en la transición a un tumor positivo para PNI.

25 Otros genes que se encontró que estaban regulados de forma negativa en tumores PNI fueron los que codifican la espermina sintasa, el homólogo del oncogén *v-MAF* (*MAF*) y *CXDAR*. La espermina sintasa es una enzima clave de la ruta de síntesis de las poliaminas, que cataliza la conversión de espermidina a espermina. Se ha observado una desregulación transcripcional de la ruta de la síntesis de las poliaminas en el cáncer de próstata. La espermina es un inhibidor endógeno del crecimiento de células de carcinoma de próstata. Por lo tanto, la regulación negativa de la espermina sintasa podría permitir el crecimiento y la supervivencia aumentados de las células de cáncer de próstata en un entorno perineural. *MAF* es un oncogén en linfomas y mielomas, pero se encontró que es un gen supresor tumoral candidato en el cáncer de próstata. *CXADR* tiene una función crucial en la captación de adenovirus en células humanas. Se encontró que este receptor está regulado de forma negativa en el cáncer de próstata localmente avanzado, cuando se compara con la próstata normal.

65

Debido a que es poco probable que los efectos de un único gen provoquen PNI, los inventores llevaron a cabo un análisis de ruta para los genes que codifican proteínas que estaban expresados de forma distinta entre tumores PNI y tumores no PNI. Este análisis reveló que los procesos biológicos alterados de forma más significativa en tumores PNI, cuando se los comparaba con tumores no PNI, son los que regulan el metabolismo celular y energético. Otros procesos biológicos alterados se relacionan con las funciones neuronales, tales como la neurogénesis y la transmisión del impulso nervioso, y con la regulación negativa de la muerte celular. Lo último concuerda con hallazgos anteriores sobre que las células de cáncer de próstata, en un emplazamiento perineural, muestran apoptosis y supervivencia aumentadas.

Los inventores observaron alteraciones significativas en la expresión de microARN y ARNm en la transición desde un tumor no PNI a un tumor PNI. El agrupamiento jerárquico no supervisado reveló que los tumores no PNI son más distintos de los tumores PNI por su perfil de expresión de microARN que por su perfil de expresión de ARNm. Además, los inventores identificaron diversos genes y procesos biológicos relacionados con la función mitocondrial y el metabolismo celular que podrían ser funcionalmente significativos en la PNI.

### EJEMPLOS DE LOS USOS Y SUS DEFINICIONES

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, métodos convencionales de farmacología, química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro de las habilidades en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, Vol. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); A. L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

Como tales, las definiciones en el presente documento se proporcionan para una explicación adicional y no para considerarlas como limitativas.

Los artículos “un” y “una” se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

Un “marcador” y “biomarcador” es un gen y/o proteína y/o variantes funcionales de los mismos cuyo nivel de expresión alterado en un tejido o célula con respecto a su nivel de expresión en un tejido o célula normal o sano está asociado a un trastorno y/o patología.

El nivel “normal” de expresión de un marcador es el nivel de expresión del marcador en células de un sujeto humano o paciente no aquejado de un trastorno y/o patología.

Una “expresión aumentada” o “nivel de expresión significativamente más elevado” de un marcador se refiere a un nivel de expresión en una muestra de prueba que es mayor que el error típico del ensayo empleado para evaluar la expresión, y en determinadas realizaciones, al menos el doble, y en otras realizaciones, tres, cuatro, cinco o diez veces el nivel de expresión del marcador en una muestra de control (por ejemplo, muestra procedente de un sujeto sano que no tiene el marcador asociado al trastorno y/o a la patología) y en determinadas realizaciones, el nivel de expresión promedio del marcador en varias muestras de control.

Un “nivel de expresión significativamente más bajo” de un marcador se refiere a un nivel de expresión en una muestra de control que es al menos el doble, y en determinadas realizaciones, tres, cuatro, cinco o diez veces más bajo que el nivel de expresión del marcador en una muestra de control (por ejemplo, muestra procedente de un sujeto sano que no tiene el marcador asociado a un trastorno y/o patología) y en determinadas realizaciones, el nivel de expresión promedio del marcador en varias muestras de control.

Un kit es una fabricación (por ejemplo un recipiente o envase) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, una sonda, para detectar de forma específica la expresión de un marcador. El kit se puede promover, distribuir o vender como una unidad para la realización de métodos de la presente invención.

“Proteínas” abarca a proteínas marcadoras y sus fragmentos; proteínas marcadoras variantes y sus fragmentos; péptidos y polipéptidos que comprenden al menos un segmento de 15 aminoácidos de una proteína marcadora o proteína marcadora variante; y proteínas de fusión que comprenden una proteína marcadora o proteína marcadora variante, o al menos un segmento de 15 aminoácidos de una proteína marcadora o proteína marcadora variante.

Las composiciones, kits y métodos descritos en el presente documento tienen los siguientes usos no limitativos, entre otros:

- 1) evaluar si un sujeto está aquejado de un trastorno y/o patología;
- 2) evaluar la fase de un trastorno y/o patología en un sujeto;
- 3) evaluar el grado de un trastorno y/o patología en un sujeto;

- 4) evaluar la naturaleza de un trastorno y/o patología en un sujeto;
- 5) evaluar el potencial para desarrollar un trastorno y/o patología en un sujeto;
- 6) evaluar el tipo histológico de células asociadas a un trastorno y/o patología en un sujeto;
- 7) fabricar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o derivados de anticuerpos que sean útiles para tratar un trastorno y/o patología en un sujeto;
- 8) evaluar la presencia de un trastorno y/o patología en las células de un sujeto;
- 9) evaluar la eficacia de uno o más compuestos de prueba para inhibir un trastorno y/o patología en un sujeto;
- 10) evaluar la eficacia de una terapia para inhibir un trastorno y/o patología en un sujeto;
- 11) controlar la evolución de un trastorno y/o patología en un sujeto;
- 12) seleccionar una composición o terapia para inhibir un trastorno y/o patología en un sujeto;
- 13) tratar un sujeto aquejado de un trastorno y/o patología;
- 14) inhibir un trastorno y/o patología en un sujeto;
- 15) evaluar el potencial nocivo de un compuesto de prueba; y
- 16) prevenir el inicio de un trastorno y/o patología en un sujeto en riesgo de ello.

#### Métodos de cribado

Se pueden crear modelos animales para permitir el cribado de agentes terapéuticos útiles para tratar o prevenir un trastorno y/o patología en un sujeto. Por consiguiente, los métodos son útiles para identificar agentes terapéuticos para tratar o prevenir un trastorno y/o patología en un sujeto. Los métodos comprenden administrar un agente candidato a un modelo animal preparado por los métodos descritos en el presente documento, y evaluar al menos una respuesta en el modelo animal en comparación con un modelo animal de control al que no se ha administrado el agente candidato. Si al menos una respuesta es una reducción de los síntomas o un retraso del inicio, el agente candidato es un agente para tratar o prevenir la enfermedad.

Los agentes candidatos pueden ser agentes farmacológicos ya conocidos en la técnica o pueden ser agentes que anteriormente se desconociera que tuvieran alguna actividad farmacológica. Los agentes pueden surgir de forma natural o diseñarse en el laboratorio. Se los puede aislar a partir de microorganismos, animales o plantas, o pueden producirse de forma recombinante, o sintetizarse mediante cualquier método químico adecuado. Pueden ser moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos o peptidomiméticos. En determinadas realizaciones, los agentes candidatos son compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas. También se encuentran a los agentes candidatos entre biomoléculas incluyendo, pero sin limitación: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los agentes candidatos se obtienen a partir de una amplia diversidad de fuentes incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Existen, por ejemplo, numerosos medios disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, están disponibles o se pueden producir fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en la forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. De forma adicional, las bibliotecas y compuestos producidos de forma natural o sintética se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden utilizarse para producir bibliotecas combinatorias. En determinadas realizaciones, los agentes candidatos pueden obtenerse utilizando cualquiera de las numerosas estrategias en la técnica de los métodos de bibliotecas combinatorias, incluyendo, como ejemplos no limitativos: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida o de fase en solución paralelas abordables de forma espacial; métodos de biblioteca sintética que necesitan deconvolución; el método de biblioteca "un lecho un compuesto"; y métodos de biblioteca sintéticos utilizando selección por cromatografía de afinidad.

En determinadas realizaciones adicionales, determinados agentes farmacológicos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o al azar, tal como la acilación, la alquilación, la esterificación, la amidificación, etc. para producir análogos estructurales.

También pueden utilizarse los mismos métodos para identificar agentes terapéuticos para tratar un trastorno y/o patología en un sujeto, para validar compuestos/agentes principales generados a partir de estudios *in vitro*.

El agente candidato puede ser un agente que regule de forma positiva o negativa uno o más trastornos y/o patologías en una ruta de respuesta del sujeto. En determinadas realizaciones, el agente candidato puede ser un antagonista que afecta a tal ruta.

#### Métodos para tratar un trastorno y/o patología

Se proporcionan en el presente documento métodos para tratar, inhibir, aliviar o revertir una respuesta de un trastorno y/o patología. En los métodos descritos en el presente documento, se administra un agente que interfiere con una cascada de señalización a un individuo que lo necesite, como tal, pero sin limitación, a sujetos en quienes tales complicaciones no son todavía evidentes y los que ya tienen al menos una de tales respuestas.

En el ejemplo anterior, tal tratamiento es útil para prevenir la aparición de tal respuesta y/o reducir el grado en el que se producen. En el último ejemplo, tal tratamiento es útil para reducir el grado al que tal respuesta se produce, prevenir su desarrollo posterior o invertir la respuesta.

- 5 En determinadas realizaciones, el agente que interfiere con la cascada de respuestas puede ser un anticuerpo específico para tal respuesta.

*Expresión de biomarcador (o biomarcadores)*

- 10 La expresión de un marcador puede inhibirse de varios modos, incluyendo, a modo de ejemplo no limitativo, un oligonucleótido antisentido que se puede proporcionar a las células de la enfermedad para inhibir la transcripción, la traducción o ambas, del marcador (o marcadores). Como alternativa, se puede proporcionar a la célula un polinucleótido que codifica un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une de forma específica a una proteína marcadora, y unido operativamente con una región promotora/reguladora apropiada, para generar anticuerpos intracelulares que inhibirán la función o actividad de la proteína. La expresión y/o función de un marcador también puede inhibirse tratando a la célula de la enfermedad con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se una de forma específica a una proteína marcadora. Utilizando los métodos descritos en el presente documento, se puede cribar diversas moléculas, incluyendo de forma particular moléculas suficientemente pequeñas que tengan la capacidad de cruzar la membrana celular, para identificar moléculas que inhiban la expresión de un marcador o inhiban la función de una proteína marcadora. El compuesto así identificado se puede proporcionar a un sujeto para inhibir células de la enfermedad del sujeto.

- Se puede utilizar en las composiciones, kits y métodos descritos en el presente documento cualquier marcador o combinación de marcadores, así como cualesquiera marcadores determinados en combinación con los marcadores.
- 25 En general, es conveniente utilizar marcadores para los que la diferencia entre el nivel de expresión del marcador en células de enfermedad y el nivel de expresión del mismo marcador en células del sistema normal sea tan grande como sea posible. Aunque esta diferencia puede ser tan pequeña como el límite de detección del método para evaluar la expresión del marcador, es conveniente que la diferencia sea al menos mayor que el error típico del método evaluado, y, en determinadas realizaciones, una diferencia de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 100, 500, 1000 veces o mayor que el nivel de expresión del mismo marcador en tejido normal.

- Se reconoce que determinadas proteínas marcadoras se secretan al espacio extracelular que rodea las células. Estos marcadores se utilizan en determinadas realizaciones de las composiciones, kits y métodos, debido al hecho de que tales proteínas marcadoras pueden detectarse en una muestra de fluido corporal, la cual puede recogerse de una forma más fácil a partir de un sujeto humano que una muestra de biopsia de tejido. Además, las técnicas para la detección *in vivo* de una proteína marcadora incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido frente a la proteína. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radioactivo cuya presencia y emplazamiento en un sujeto se puede detectar mediante técnicas convencionales de formación de imágenes.

- 40 Para determinar si alguna proteína marcadora particular es una proteína secretada, la proteína marcadora se expresa en, por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una línea celular humana, se recoge fluido extracelular, y se evalúa la presencia o ausencia de la proteína en el fluido extracelular (por ejemplo utilizando un anticuerpo marcado que se une de forma específica a la proteína).

- 45 Se apreciará que las muestras objeto que contienen tales células pueden utilizarse en los métodos descritos en el presente documento. En estas realizaciones, el nivel de expresión del marcador se puede evaluar evaluando la cantidad (por ejemplo, cantidad absoluta o concentración) del marcador en una muestra. La muestra de células puede, por supuesto, someterse a diversas técnicas preparativas y de almacenamiento posrecogida (por ejemplo, extracción de ácidos nucleicos y/o de proteínas, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación, etc.) antes de evaluar la cantidad del marcador en la muestra.

- También se apreciará que los marcadores pueden diseminarse desde las células a, por ejemplo, el sistema respiratorio, sistema digestivo, la circulación sanguínea y/o los espacios intersticiales. Los marcadores diseminados pueden analizarse, por ejemplo, examinando el esputo, LBA, suero, plasma, orina, deposiciones, etc.

- 55 Pueden utilizarse composiciones, kits y métodos para detectar la expresión de proteínas marcadoras que tengan al menos una porción que se presenta en la superficie de las células que las expresan. Por ejemplo, pueden utilizarse métodos inmunológicos para detectar tales proteínas sobre células completas, o pueden utilizarse métodos de análisis de secuencia basados en ordenador para predecir la presencia de al menos un dominio extracelular (es decir, que incluya tanto proteínas secretadas como a proteínas que tengan al menos un dominio en la superficie celular). La expresión de una proteína marcadora que tenga al menos una porción que se presente en la superficie de una célula que la exprese se puede detectar sin necesariamente lizar la célula (por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se une de forma específica a un dominio de superficie celular de la proteína).

- 65 La expresión de un marcador puede evaluarse mediante cualquiera de una amplia diversidad de métodos para la detección de la expresión de un ácido nucleico o proteína transcrito. Los ejemplos no limitativos de tales métodos

incluyen métodos inmunológicos para la detección de proteínas secretadas, de superficie celular, citoplasmáticas o nucleares, métodos de purificación de proteínas, ensayos para la función o actividad de proteínas, métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos y métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

5 En una realización particular, la expresión de un marcador se evalúa utilizando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un pareja proteína-ligando), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario, un dominio hipervariable de un anticuerpo aislado, etc.) que se una de forma específica a una proteína marcadora o fragmento de la misma, incluyendo una proteína marcadora que haya experimentado toda o una parte de la modificación postraduccion normal.

15 En otra realización particular, la expresión de un marcador se evalúa preparando ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) procedente de células en una muestra objeto, e hibridando el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que sea un complemento de un ácido nucleico marcador, o un fragmento del mismo. El ADNc puede, de forma opcional, amplificarse utilizando cualquiera de diversos métodos de la reacción en cadena de la polimerasa antes de la hibridación con el polinucleótido de referencia; preferentemente, no se amplifica. La expresión de uno o más marcadores puede asimismo detectarse utilizando PCR cuantitativa para evaluar el nivel de expresión del marcador (o marcadores). Como alternativa, pueden utilizarse para detectar la presencia de un marcador en un sujeto cualquiera de los muchos métodos de detección de mutaciones o variantes (por ejemplo, polimorfismos de un único nucleótido, deleciones, etc.) de un marcador.

25 En una realización relacionada, una mezcla de polinucleótidos transcritos obtenidos de la muestra se pone en contacto con un sustrato que tiene fijado a el un polinucleótido complementario a, u homólogo con, al menos una porción (por ejemplo, al menos 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500, o más restos de nucleótido) de un ácido nucleico marcador. Si los polinucleótidos complementarios a, u homólogos con, son detectables de forma diferencial por el sustrato (por ejemplo, detectables utilizando distintos cromóforos o fluoróforos, o fijados a distintas posiciones seleccionadas), entonces se pueden evaluar los niveles de expresión de una pluralidad de marcadores de forma simultánea utilizando un único sustrato (por ejemplo, una micromatriz de "chip de genes" de polinucleótidos fijados en posiciones seleccionadas). Cuando se utiliza un método para evaluar de expresión de marcadores que implica la hibridación de un ácido nucleico con otro, es conveniente que la hibridación se realice en condiciones de hibridación rigurosas.

35 En determinadas realizaciones, los ensayos de biomarcador se pueden realizar utilizando espectrometría de masas o resonancia de plasmón superficial. En diversas realizaciones, el método de identificación de un agente activo frente a un trastorno y/o patología en un sujeto puede incluir uno o más de: a) proporcionar una muestra de células que contenga uno o más marcadores o derivados de los mismos; b) preparar un extracto a partir de tales células; c) mezclar el extracto con una sonda de ácido nucleico marcada que contenga un sitio de unión al marcador; y d) determinar la formación de un complejo entre el marcador y la sonda de ácido nucleico en presencia o ausencia del agente de prueba. La etapa de determinación puede incluir someter dicha mezcla de extracto/sonda de ácido nucleico a un ensayo de cambio de movilidad electroforético.

45 En determinadas realizaciones, la etapa de determinación comprende un ensayo seleccionado de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), ensayos basados en fluorescencia y ensayos rendimiento ultraelevado, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial (RPS) o ensayos de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS, siglas del inglés: *fluorescence correlation spectroscopy*). En tales realizaciones, el sensor de FCS es útil para la observación directa en tiempo real de las interacciones biomoleculares, dado que la FCS es sensible a diminutos cambios del índice de refracción en una superficie metálico-dieléctrica. La FCS es una técnica de superficie que es sensible a los cambios desde  $10^5$  hasta  $10^{-6}$  unidades de índice de refracción (IR) dentro de aproximadamente 200 nm de la interfaz de sensor/muestra de la FCS. Por lo tanto, la espectroscopía de FCS es útil para controlar el crecimiento de películas orgánicas finas depositadas en la capa de detección.

55 Debido a que las composiciones, los kits y los métodos se basan en la detección de una diferencia en los niveles de expresión de uno o más marcadores, es conveniente que el nivel de expresión del marcador sea significativamente mayor que el límite de detección mínimo del método utilizado para evaluar la expresión en al menos una de las células normales o de las células afectadas por cáncer.

60 Se comprende que mediante cribado de rutina de muestras adicionales del sujeto, utilizando uno o más de los marcadores, se entenderá que determinados marcadores están expresados de forma aumentada en células de diversos tipos, incluyendo un trastorno y/o patología específica en un sujeto.

65 Además, como se evalúa un gran número de muestras objeto para la expresión de los marcadores, y los resultados de los sujetos individuales a partir de los cuales se obtuvieron las muestras están correlacionados, también se confirmará que la expresión alterada de determinados marcadores está fuertemente correlacionada con un trastorno y/o patología en un sujeto y que la expresión alterada de otros marcadores está fuertemente correlacionada con

otras enfermedades. Las composiciones, los kits y los métodos son, así, útiles para caracterizar uno o más de la fase, grado, tipo histológico y naturaleza de un trastorno y/o patología en un sujeto.

5 Cuando las composiciones, los kits y los métodos se utilizan para caracterizar uno o más de la fase, grado, tipo histológico y la naturaleza de un trastorno y/o patología en un sujeto, es conveniente que el marcador o panel de marcadores se seleccione de tal modo que se obtiene un resultado positivo en al menos aproximadamente el 20 %, y en determinadas realizaciones, al menos aproximadamente el 40 %, el 60 % o el 80 %, y en sustancialmente todos los sujetos aquejados de un trastorno y/o patología de la correspondiente fase, grado, tipo histológico o naturaleza. El marcador o panel de marcadores de la invención puede seleccionarse de modo que se obtiene para la población  
10 general un valor predictivo positivo de mayor que aproximadamente el 10 % (en un ejemplo no limitativo, acoplado con una especificidad de ensayo mayor del 80 %).

15 Cuando en las composiciones, los kits y los métodos se utiliza una pluralidad de marcadores, el nivel de expresión de cada marcador en una muestra del sujeto puede compararse con el nivel normal de expresión de cada uno de la pluralidad de marcadores en muestras sin trastorno y/o sin enfermedad del mismo tipo, ya sea en una única mezcla de reacción (es decir utilizando reactivos, tales como distintas sondas fluorescentes, para cada marcador) o en mezclas de reacción individuales que corresponden a uno o más de los marcadores. En una realización, un nivel significativamente aumentado de la expresión de más de uno de la pluralidad de marcadores en la muestra, con respecto a los correspondientes niveles normales, es una indicación de que el sujeto está aquejado de un trastorno  
20 y/o patología. Cuando se utiliza una pluralidad de marcadores, se pueden utilizar 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 20, 30 o 50 o más marcadores individuales; en determinadas realizaciones, puede ser conveniente el uso de menos marcadores.

25 Para maximizar la sensibilidad de las composiciones, los kits y los métodos (es decir, mediante interferencia que se puede atribuir a las células del sistema de origen en una muestra del sujeto), es conveniente que el marcador utilizado allí sea un marcador que tenga una distribución tisular restringida, por ejemplo, que normalmente no se expresa en un tejido que no sea del sistema.

30 Se reconoce que las composiciones, los kits y los métodos serán de particular utilidad para sujetos que tengan un riesgo potenciado de desarrollar un trastorno y/o patología en un sujeto y para sus consejeros médicos. Los sujetos reconocidos como que tienen un riesgo potenciado de desarrollar un trastorno y/o enfermedad incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen un historial familiar de tal trastorno o enfermedad.

35 El nivel de expresión de un marcador en tejido del sistema humano normal se puede evaluar en diversos modos. En una realización, este nivel normal de expresión se evalúa evaluando el nivel de expresión del marcador en una parte de las células del sistema que parecen ser normales, y comparando este nivel normal de expresión con el nivel de expresión en una parte de las células del sistema que se sospecha que son anómalas. Como alternativa, y en particular a medida que se hace disponible información adicional como resultado de la realización de rutina de los métodos descritos en el presente documento, se pueden utilizar los valores promedio de la población para la  
40 expresión normal de los marcadores. En otras realizaciones, el nivel "normal" de expresión de un marcador puede determinarse evaluando la expresión del marcador en una muestra del sujeto obtenida de un sujeto no aquejado, de una muestra del sujeto obtenida de un sujeto antes del inicio sospechado de un trastorno y/o patología en el sujeto, de muestras objeto archivadas, y similares.

45 También se proporcionan en el presente documento composiciones, kits y métodos para evaluar la presencia de células del trastorno y/o de la patología en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido archivada o una muestra obtenida de un sujeto). Estas composiciones, kits y métodos son sustancialmente los mismos que los descritos anteriormente, excepto que, cuando es necesario, las composiciones, los kits y los métodos se adaptan para su uso con muestras que no sean las muestras objeto. Por ejemplo, cuando la muestra a utilizar es una muestra de tejido humano parafinada archivada, puede ser necesario ajustar la proporción de compuestos en una composición, en los  
50 kits o los métodos utilizados para evaluar los niveles de expresión del marcador en una muestra.

#### *Kits y reactivos*

55 Los kits son útiles para evaluar la presencia de células de la enfermedad (por ejemplo en una muestra tal como una muestra del sujeto). El kit comprende una pluralidad de reactivos, cada uno de los cuales tiene la capacidad de unirse de forma específica a un ácido nucleico o proteína marcadores. Los reactivos adecuados para la unión con una proteína marcadora incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y similares. Los reactivos adecuados para la unión con un ácido nucleico marcador (por ejemplo, un ADN genómico, un ARNm, un  
60 ARNm cortado y empalmado, un ADNc, o similares) incluyen ácidos nucleicos complementarios. Por ejemplo, los reactivos de ácido nucleico pueden incluir oligonucleótidos (marcados o no marcados) fijados a un sustrato, oligonucleótidos marcados no unidos a un sustrato, parejas de cebadores para PCR, sondas de baliza molecular, y similares.

65 Los kits pueden comprender de forma opcional componentes adicionales útiles para realizar los métodos descritos en el presente documento. A modo de ejemplo, el kit puede comprender líquidos (por ejemplo tampón SSC)

adecuados para aparear ácidos nucleicos complementarios o para unir un anticuerpo con una proteína con la que se une específicamente, uno o más compartimentos de muestras, un material instructivo que describe la realización del método, una muestra de células de sistema normal, una muestra de células de la enfermedad relacionada con el cáncer y similares.

5 *Métodos de producción de anticuerpos*

También se proporciona en el presente documento un método de fabricación de un hibridoma aislado que produce un anticuerpo útil para evaluar si un sujeto está aquejado de un trastorno y/o patología. En este método, se sintetiza o aísla una proteína o péptido que comprende la totalidad o un segmento de una proteína marcadora (por ejemplo, mediante purificación a partir de una célula en la que se expresa o mediante transcripción y traducción de un ácido nucleico que codifica la proteína o péptido *in vivo* o *in vitro*). Utilizando la proteína o el péptido se inmuniza un vertebrado, por ejemplo, un mamífero tal como un ratón, rata, conejo u oveja. El vertebrado puede, de forma opcional (y de forma preferente) inmunizarse al menos una vez adicional con la proteína o péptido, de modo que el vertebrado presente una respuesta inmunitaria robusta para la proteína o el péptido. Se aíslan esplenocitos a partir del vertebrado inmunizado y se fusionan con una línea celular inmortalizada para formar hibridomas, utilizando cualquiera de diversos métodos. Después, los hibridomas formados de esta manera, se criban utilizando métodos convencionales para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une de forma específica a la proteína marcadora o a un fragmento de la misma. También se proporcionan en el presente documento hibridomas fabricados mediante este método y los anticuerpos fabricados utilizando tales hibridomas.

*Métodos para la evaluación de la eficacia*

También se proporciona en el presente documento un método para evaluar la eficacia de un compuesto de prueba para inhibir las células de la enfermedad. Como se describió anteriormente, las diferencias en el nivel de expresión de los marcadores correlacionan con el estado anómalo de las células del sujeto. Aunque se reconoce que los cambios en los niveles de expresión de determinados marcadores probablemente son el resultado del estado anómalo de tales células, se reconoce asimismo que los cambios en los niveles de expresión de otro de los marcadores inducen, mantienen y promueven el estado anómalo de esas células. Por lo tanto, los compuestos que inhiben un trastorno y/o patología en un sujeto provocarán que el nivel de expresión de uno o más de los marcadores cambie a un nivel más cercano al nivel normal de expresión para ese marcador (es decir, el nivel de expresión para el marcador en células normales).

Por lo tanto, este método comprende comparar la expresión de un marcador en una primera muestra de células mantenida en presencia del compuesto de prueba y la expresión del marcador en una segunda muestra de células mantenida en ausencia del compuesto de prueba. Una expresión significativamente reducida de un marcador en presencia del compuesto de prueba es una indicación de que el compuesto de prueba inhibe una enfermedad relacionada. Las muestras de células pueden, por ejemplo, ser alícuotas de una muestra única de células normales obtenida de un sujeto, muestras agrupadas de células normales obtenidas de un sujeto, células de una línea celular normal, alícuotas de una muestra única de células de una enfermedad relacionada obtenida de un sujeto, muestras agrupadas de células de una enfermedad relacionada obtenida de un sujeto, células de una línea celular de una enfermedad relacionada, o similar.

En una realización, las muestras son células de una enfermedad relacionadas con el cáncer obtenida de un sujeto, y se prueba una pluralidad de compuestos que se cree que son eficaces para inhibir diversas enfermedades relacionadas con el cáncer para identificar el compuesto que es probable que mejor inhiba la enfermedad relacionada con el cáncer en el sujeto.

Asimismo, este método puede utilizarse para evaluar la eficacia de una terapia para inhibir en un sujeto una enfermedad relacionada. En este método se evalúa el nivel de expresión de uno o más marcadores en una pareja de muestras (una sometida a la terapia, la otra no sometida a la terapia). Como con el método de evaluación de la eficacia de los compuestos de prueba, si la terapia induce un nivel significativamente más bajo de la expresión de un marcador, entonces la terapia es eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer. Como anteriormente, si se utilizan en este método las muestras procedentes de un sujeto seleccionado, después se pueden evaluar terapias alternativas *in vitro* para seleccionar una terapia que sea más probablemente eficaz para inhibir una enfermedad relacionada con el cáncer en el sujeto.

Como se describe en el presente documento, el estado de las células humanas se correlaciona con cambios en los niveles de expresión de los marcadores. También se proporciona un método para evaluar el potencial nocivo de un compuesto de prueba. Este método comprende mantener alícuotas separadas de células humanas en presencia y ausencia del compuesto de prueba. Se compara la expresión de un marcador en cada una de las alícuotas. Un nivel de expresión de un marcador significativamente más elevado en la alícuota mantenida en presencia del compuesto de prueba (con respecto a la alícuota mantenida en ausencia del compuesto de prueba) es una indicación de que el compuesto de prueba posee un potencial nocivo. Se puede evaluar el potencial nocivo relativo de diversos compuestos de prueba comparando el grado de potenciación o inhibición del nivel de expresión de los marcadores relevantes, comparando el número de marcadores para los que el nivel de expresión está potenciado o inhibido, o

comparando ambos. En las siguientes subsecciones se describen adicionalmente diversos aspectos.

#### *Proteínas aisladas y anticuerpos*

5 Un aspecto está relacionado con proteínas marcadoras aisladas y porciones biológicamente activas de las mismas, así como a fragmentos de polipéptido adecuados para su uso como inmunogénicos para originar anticuerpos dirigidos frente a una proteína marcadora o un fragmento de la misma. En una realización, la proteína marcadora nativa se puede aislar a partir de fuentes de células o tejidos mediante un esquema de purificación apropiado, utilizando técnicas de purificación de proteínas convencionales. En otra realización, se produce mediante técnicas de ADN recombinante una proteína o péptido que comprenden la proteína marcadora entera o un segmento. Como alternativa a la expresión recombinante, tal proteína o péptido se puede sintetizar de forma química utilizando técnicas de síntesis de péptidos convencionales.

15 Una proteína, o porción biológicamente activa de la misma, "aislada" o "purificada", está sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente de células o tejidos a partir de la cual la proteína se obtiene, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se la sintetiza de forma química. La frase "sustancialmente libre de material celular" incluye a preparaciones de proteína en las que la proteína se separa a partir de componentes celulares de las células de las que se aísla o de las que se produce de forma recombinante. Por lo tanto, la proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30 %, el 20 %, el 10 % o el 5 % (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en el presente documento como una "proteína contaminante").

25 Cuando la proteína o porción biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, también está preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, el 10 % o el 5 % del volumen de la preparación de proteína. Cuando la proteína se produce mediante síntesis química está preferentemente sustancialmente libre de precursores químicos o de otros productos químicos, es decir, está separada de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente el 30 %, el 20 %, el 10 %, el 5 % (en peso seco) de precursores o productos químicos que no son el polipéptido de interés.

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

45 Además, pueden utilizarse bibliotecas de segmentos de una proteína marcadora para generar una población variegada de polipéptidos para el cribado y la posterior selección de proteínas marcadoras variantes o segmentos de las mismas.

#### 50 *Medicina predictiva*

También se proporcionan en el presente documento los usos de los modelos animales y marcadores en el campo de la medicina predictiva, en la que se utilizan ensayos de diagnóstico, ensayos pronósticos, farmacogenómica y ensayos clínicos de control para fines pronósticos (predictivos), para tratar de este modo a un individuo de forma profiláctica. Por consiguiente, también se proporcionan en el presente documento ensayos diagnósticos para determinar el nivel de expresión de una o más proteínas o ácidos nucleicos marcadores, para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar un trastorno y/o enfermedad particular. Tales ensayos se pueden utilizar para fines pronósticos o predictivos, para tratar de este modo de forma profiláctica a un individuo antes del inicio del trastorno y/o enfermedad.

60 En otro aspecto, los métodos son útiles al menos para el cribado periódico del mismo individuo para ver si ese individuo se ha expuesto a productos químicos o toxinas que cambian los patrones de expresión de él o ella.

65 Todavía otro aspecto está relacionado con el control de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos u otros compuestos) administrados, ya sea para inhibir un trastorno y/o enfermedad o para tratar o prevenir cualquier otro trastorno (por ejemplo, para comprender cualquiera de los efectos del sistema que tal tratamiento puede tener),



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

#### *Composiciones farmacéuticas*

5 Los compuestos pueden estar en una formulación en un transportador farmacéutico adecuado para la administración por vía tópica, vía local o vía sistémica. Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª Edición por E. W. Martin (Mark Publishing Company, 1975), divulga transportadores y métodos de preparación típicos. También, los compuestos pueden estar encapsulados en microcápsulas, micropartículas o microesferas biocompatibles adecuadas formadas de polímeros biodegradables o no biodegradables, o de proteínas o liposomas para dirigirse a células. Tales sistemas son bien conocidos para los expertos en la materia y pueden optimizarse para su uso con el ácido nucleico apropiado.

15 Se describen diversos métodos para la entrega de ácido nucleico, por ejemplo en Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York; y Ausubel *et al.*, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York. Tales sistemas de entrega de ácidos nucleicos comprenden al ácido nucleico deseado, a modo de ejemplo y no como limitación, ya sea en forma "desnuda" o como un ácido nucleico "desnudo", o formulado en un vehículo adecuado para su entrega, tal como en un complejo con una molécula catiónica o un lípido que forma liposomas, o como un componente de un vector, o un componente de una composición farmacéutica. El sistema de entrega de ácidos nucleicos se puede proporcionar a la célula ya sea de forma directa, tal como poniéndolo en contacto con la célula, o de forma indirecta, tal como a través de la acción de cualquier proceso biológico.

25 Las formulaciones para la administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Según se desee, pueden utilizarse transportadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, o espesantes.

30 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tales como, por ejemplo, mediante las vías intrarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones de inyección isotónicas estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hagan a la formulación isotónica con la sangre del destinatario previsto, y suspensiones, soluciones o emulsiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, agentes de dispersión, estabilizadores y conservantes. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, en ampollas o en envases de multidosis, con un conservante añadido. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diversos parámetros para preparar y fórmulas las composiciones sin recurrir excesiva a experimentación. Los compuestos pueden utilizarse solos o en combinación con otros compuestos adecuados.

40 En general, los métodos para administrar compuestos, incluyendo ácidos nucleicos, son bien conocidos en la técnica. En particular, las vías de administración ya en uso para las terapias de ácido nucleico, junto con las formulaciones de uso actual, proporcionan vías preferentes de administración, y la formulación para los ácidos nucleicos seleccionados dependerá, por supuesto, de factores tales como la formulación particular, la gravedad del estado del sujeto a tratar, y la dosificación necesaria para la eficacia terapéutica. Como se utiliza en general en el presente documento, una "cantidad eficaz" es la cantidad que tiene la capacidad de tratar uno o más síntomas del trastorno, de revertir la evolución de uno o más síntomas del trastorno, de detener la evolución de uno o más síntomas del trastorno o de prevenir la aparición de uno o más síntomas del trastorno en un sujeto al que se administra la formulación, en comparación con un sujeto emparejado que no recibe el compuesto. Las cantidades eficaces reales del compuesto pueden variar de acuerdo con el compuesto específico y la combinación del mismo a utilizar, la composición particular formulada, el modo de administración, y la edad, el peso, el estado del individuo y la gravedad de los síntomas o de la afección a tratar.

50 Puede utilizarse para administrar una formulación al sujeto cualquier método aceptable conocido para alguien con la experiencia habitual en la técnica. La administración ser localizada (es decir, en una región, sistema fisiológico, tejido, órgano o tipo celular particular) o puede ser sistémica, dependiendo de la afección a tratar.

#### 55 *Farmacogenómica*

60 Los marcadores también son útiles como marcadores farmacogenómicos. Como se utiliza en el presente documento, un "marcador farmacogenómico" es un marcador bioquímico objetivo cuyo nivel de expresión correlaciona con una respuesta o susceptibilidad farmacológica clínica concreta en un sujeto. La presencia o la cantidad de la expresión del marcador farmacogenómico se relaciona con la respuesta predicha del sujeto, y de forma más particular el tumor del sujeto, a la terapia con un fármaco concreto o una clase de fármacos. Evaluando la presencia o cantidad de la expresión de uno o más marcadores farmacogenómicos en un sujeto, se puede seleccionar una terapia farmacológica que sea más apropiada para el sujeto, o que se predice que tenga un mayor grado de éxito.

65

*Ensayos clínicos de control*

El control de incidencia de los agentes (por ejemplo, compuestos farmacológicos) sobre el nivel de expresión de un marcador puede aplicarse no solo en el cribado farmacológico básico, sino también en los ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente para afectar la expresión del marcador se puede controlar en ensayos clínicos de sujetos que reciben tratamiento para una enfermedad relacionada con el cáncer.

En una realización no limitativa, la presente invención proporciona un método para controlar la eficacia del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato) que comprende las etapas de:

- i) obtener de un sujeto una muestra de preadministración antes de la administración del agente;
- ii) detectar en la muestra de preadministración el nivel de expresión de uno o más marcadores seleccionados;
- iii) obtener una o más muestras posadministración del sujeto;
- iv) detectar el nivel de expresión del marcador (o marcadores) en las muestras posadministración;
- v) comparar el nivel de expresión del marcador (o marcadores) en la muestra de preadministración con el nivel de expresión del marcador (o marcadores) en la muestra o muestras de posadministración; y
- vi) modificar por consiguiente la administración del agente al sujeto.

Por ejemplo, la expresión aumentada del gen marcador (o genes marcadores) durante el transcurso del tratamiento puede indicar una dosificación ineficaz y la conveniencia de aumentar la dosificación. Por el contrario, la expresión disminuida del gen marcador (o genes marcadores) puede indicar un tratamiento eficaz o la no necesidad de cambiar la dosificación.

*Medios legibles mediante aparatos electrónicos, sistemas, matrices y métodos para el uso de los mismos*

Como se utiliza en el presente documento, "medios legibles mediante aparatos electrónicos" se refiere a cualquier medio adecuado para almacenar, guardar y contener datos o información que puedan leerse y a los que se pueda acceder de forma directa mediante un aparato electrónico. Tales medios pueden incluir, pero sin limitación: medios de almacenamiento magnético, tales como discos flexibles, un medio de almacenamiento en disco duro y cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tales como un disco compactos; medios de almacenamiento electrónico tales como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares; y en general discos duros e híbridos de estas categorías, tales como medios de almacenamiento magnético/óptico. El medio se adapta o configura para tener registrado en él un marcador como se describe en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "aparato electrónico" se pretende que incluya cualquier aparato de computación o de procesamiento adecuado, u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Los ejemplos de aparatos electrónicos adecuados para su uso con la presente invención incluyen aparatos de computación autónomos; redes, incluyendo una red de área local (LAN), una red de área amplia (WAN), Internet, Intranet y Extranet; aparatos electrónicos tales como asistentes personales digitales (PDA), teléfono móvil, localizador y similar; y sistemas de procesamiento locales y distribuidos.

Como se utiliza en el presente documento, "registrado" se refiere a un proceso para el almacenamiento o la codificación de información en el medio legible por aparatos electrónicos. Los expertos en la materia pueden adoptar fácilmente cualquier método para el registro de información en el medio para generar materiales que comprendan los marcadores descritos en el presente documento.

Pueden utilizarse diversos programas informáticos y de formatos para almacenar la información del marcador de la presente invención en el medio legible por aparatos electrónicos. Puede emplearse para obtener o crear un medio que tenga registrado en él a los marcadores cualquier cantidad de formatos de estructuración de un procesador de datos (por ejemplo, un archivo de texto o una base de datos). Proporcionando los marcadores en una forma legible, se puede acceder de forma rutinaria a la información de la secuencia del marcador para diversos fines. Por ejemplo, un experto en la materia puede utilizar las secuencias de nucleótidos o aminoácidos en una forma legible para comparar una secuencia diana o un motivo estructural diana con la información de la secuencia almacenada en los medios de almacenamiento de datos. Para identificar fragmentos o regiones de las secuencias que coincidan con una secuencia diana o motivo diana particular se utilizan medios de búsqueda.

Por lo tanto, también se proporciona en el presente documento un medio para contener instrucciones para realizar un método para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer o una predisposición para una enfermedad relacionada con el cáncer, en el que el método comprende las etapas de determinar la presencia o ausencia de un marcador y, a base de la presencia o ausencia del marcador, determinar si el sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer o una predisposición a una enfermedad relacionada con el cáncer, y/o recomendar un tratamiento particular para una enfermedad relacionada con el cáncer o una afección relacionada con pre cáncer.

5 También se proporciona en el presente documento un sistema electrónico y/o en una red, un método para determinar si un sujeto tiene una enfermedad relacionada con el cáncer o una predisposición a una enfermedad relacionada con el cáncer asociada a un marcador, en el que el método comprende las etapas de determinar la presencia o ausencia del marcador, y a base de la presencia o ausencia del marcador, determinar si el sujeto tiene un trastorno y/o enfermedad particular o una predisposición a tal trastorno y/o enfermedad, y/o recomendar un tratamiento particular para tal enfermedad o trastorno y/o tal afección relacionada con pre cáncer. El método puede comprender adicionalmente la etapa de recibir información fenotípica asociada al sujeto y/o adquirir de una red información fenotípica asociada al sujeto.

10 También se proporciona en el presente documento una red, un método para determinar si un sujeto tiene un trastorno y/o enfermedad o una predisposición a un trastorno y/o enfermedad asociada a un marcador, comprendiendo el método las etapas de recibir información asociada al marcador, recibir información fenotípica asociada al sujeto, adquirir información procedente de la red correspondiente al marcador y/o trastorno y/o enfermedad, y a base de una o más de la información fenotípica, el marcador y la información adquirida, determinar si el sujeto tiene un trastorno y/o enfermedad o una predisposición al mismo. El método puede adicionalmente comprender la etapa de recomendar un tratamiento particular para el trastorno y/o enfermedad o predisposición al mismo.

20 También se proporciona en el presente documento un método comercial para determinar si un sujeto tiene un trastorno y/o enfermedad o una predisposición al mismo, comprendiendo el método las etapas de recibir información asociada al marcador, recibir información fenotípica asociada al sujeto, adquirir información procedente de la red correspondiente al marcador y/o a un trastorno y/o enfermedad, y a base de uno o más de la información fenotípica, el marcador y la información adquirida, determinar si el sujeto tiene un trastorno y/o enfermedad o una predisposición al mismo. El método puede comprender adicionalmente la etapa de recomendar un tratamiento particular para esto.

30 También se proporciona en el presente documento una matriz que puede utilizarse para ensayar la expresión de uno o más genes en la matriz. En una realización, la matriz puede utilizarse para ensayar la expresión de genes en un tejido para determinar la especificidad de tejido de los genes en la matriz. De esta manera, se puede ensayar de forma simultánea la expresión de hasta aproximadamente 7000 o más genes. Esto permite desarrollar un perfil que muestre una batería de genes expresados de forma específica en uno o más tejidos.

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

40 Tal determinación es útil, por ejemplo, para conocer el efecto de la interacción célula-célula al nivel de la expresión de genes. Si un agente se administra de forma terapéutica para tratar un tipo celular pero tiene un efecto no deseado sobre otro tipo celular, el método proporciona un ensayo para determinar la base molecular del efecto no deseado, y proporciona así la oportunidad de coadministrar un agente contrarrestante o tratar de otro modo el efecto no deseado. De forma similar, incluso en un único tipo celular se pueden determinar a nivel molecular los efectos biológicos no deseados. Por lo tanto, se pueden determinar y contrarrestar los efectos de un agente sobre la expresión de otro gen que no sea el gen diana.

50 En otra realización, la matriz puede utilizarse para controlar el curso temporal de la expresión de uno o más genes en la matriz. Esto puede producirse en diversos contextos biológicos, como se divulga en el presente documento, por ejemplo en la evolución de un trastorno y/o enfermedad, en la evolución del mismo, y en procesos tales como la transformación celular asociada a ellos.

55 Además, la matriz es útil para determinar el efecto de la expresión de un gen o de la expresión de otros genes en la misma célula o en células distintas. Esto permite, por ejemplo, la selección de dianas moleculares alternas para la intervención terapéutica si no puede regularse la diana definitiva o de aguas abajo.

60 La matriz también es útil para determinar los patrones de expresión diferencial de uno o más genes en células normales o anómalas. Esto proporciona una batería de genes que podría servir como una diana molecular para el diagnóstico o la intervención terapéutica.

#### *Marcadores indirectos*

65 Los marcadores pueden servir como marcadores indirectos de uno o más trastornos o patologías, o de afecciones que conduzcan a los mismos. Como se utiliza en el presente documento, un "marcador indirecto" es un marcador bioquímico objetivo que correlaciona con la ausencia o presencia de una enfermedad o trastorno, o con la evolución

de una enfermedad o trastorno. La presencia o cantidad de tales marcadores es independiente de la enfermedad. Por lo tanto, estos marcadores pueden servir para indicar si el curso particular del tratamiento es eficaz para atenuar una patología o trastorno. Los marcadores indirectos son de uso particular cuando la presencia o grado de la patología o trastorno es difícil de evaluar a través de las metodologías convencionales, o cuando se desea una evaluación de la evolución de la enfermedad antes de alcanzar un punto final clínico potencialmente peligroso.

Los marcadores también son útiles como marcadores farmacodinámicos. Como se utiliza en el presente documento, un "marcador farmacodinámico" es un marcador bioquímico objetivo que correlaciona de forma específica con los efectos farmacológicos. La presencia o cantidad de un marcador farmacodinámico no está relacionada con la patología o trastorno para la que el fármaco se está administrado; por lo tanto, la presencia o cantidad del marcador es indicativa de la presencia o actividad del fármaco en un sujeto. Por ejemplo, un marcador farmacodinámico puede ser indicativo de la concentración del fármaco en un tejido biológico, en el aspecto que el marcador se expresa o transcribe o que no se expresa o transcribe en ese tejido en relación con el nivel del fármaco. De este modo, mediante el marcador farmacodinámico se puede controlar la distribución o la captación del fármaco. De modo similar, la presencia o cantidad del marcador farmacodinámico puede estar relacionada con la presencia o cantidad del producto metabólico de un fármaco, de modo que la presencia o cantidad del marcador es indicativa de la tasa de degradación relativa del fármaco *in vivo*.

Los marcadores farmacodinámicos son de uso particular en el aumento de la sensibilidad de detección de los efectos del fármaco, en particular cuando el fármaco se administra a dosis bajas. Debido a que incluso pequeñas cantidades de un fármaco pueden ser suficientes para activar múltiples ciclos de transcripción o expresión del marcador, el marcador amplificado puede estar en una cantidad que se puede detectar más fácilmente que el propio fármaco. Además, el marcador puede detectarse de forma más fácil debido a la naturaleza del propio marcador; por ejemplo, utilizando los métodos descritos en el presente documento, para un marcador proteico pueden emplearse anticuerpos en un sistema de detección inmunobasado, o para detectar un marcador de ARNm pueden utilizarse sondas radiomarcadas específicas para el marcador. Además, el uso de un marcador farmacodinámico puede ofrecer la predicción basada en el mecanismo del riesgo debido al tratamiento farmacológico más allá del intervalo de las posibles observaciones directas.

#### 30 *Protocolos de prueba*

El método de análisis para un trastorno y/o enfermedad puede comprender, por ejemplo, medir a lo largo del tiempo el nivel de expresión de cada gen marcador en una muestra biológica procedente de un sujeto y comparar el nivel con el del gen marcador en una muestra biológica de control.

Cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento y el nivel de expresión se expresa de forma diferencial (por ejemplo, mayor o menor que el del control), se juzga que el sujeto está afectado de un trastorno y/o enfermedad. Cuando el nivel de expresión del gen marcador cae dentro del intervalo aceptable, es improbable que el sujeto esté afectado del mismo.

Para comparar los niveles de expresión el valor convencional para el control puede determinarse midiendo el nivel de expresión del gen marcador en el control. Por ejemplo, el valor convencional puede determinarse a base del nivel de expresión en el control del gen marcador anteriormente mencionado. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el intervalo aceptable se toma como más  $\pm 2$  D.T. a base del valor convencional. Una vez que se determina el valor convencional, puede realizarse el método de análisis midiendo solo el nivel de expresión en una muestra biológica procedente de un sujeto y comparando el valor con el valor convencional determinado para el control.

Los niveles de expresión de genes marcadores incluyen la transcripción a ARNm de los genes marcadores, y la traducción a proteínas. Por lo tanto, un método de análisis para un trastorno y/o enfermedad se realiza a base de la comparación de la intensidad de la expresión del ARNm correspondiente a los genes marcadores, o el nivel de expresión de proteínas que codifican los genes marcadores.

La medición de los niveles de expresión de los genes marcadores en el análisis de un trastorno y/o enfermedad se puede llevar a cabo de acuerdo con diversos métodos de análisis de genes. De forma concreta, uno puede utilizar, por ejemplo, una técnica de hibridación que utiliza como sondas ácidos nucleicos que hibridan con estos genes, o una técnica de amplificación de genes utilizando como cebadores ADN que hibrida con los genes marcadores.

Las sondas o cebadores utilizados para el análisis pueden diseñarse a base de las secuencias de nucleótidos de los genes marcadores. Los números de identificación para las secuencias de nucleótidos de los respectivos genes marcadores se describen en el presente documento.

Adicionalmente, debe comprenderse que con una frecuencia elevada los genes de animales superiores en general acompañan polimorfismos. Existen también muchas moléculas que producen isoformas que comprenden secuencias de aminoácidos mutuamente distintas durante el proceso de corte y empalme. Está incluido en los genes marcadores cualquier gen asociado a una enfermedad relacionada con el cáncer que tenga una actividad similar a la

de un gen marcador, incluso si tiene diferencias en la secuencia de nucleótidos debidas al polimorfismo o si es una isoforma.

5 También debe comprenderse que los genes marcadores pueden incluir homólogos de otras especies además de los humanos. Por lo tanto, a menos que se especifique otra cosa, la expresión "gen marcador" se refiere a un homólogo del gen marcador exclusivo para la especie o a un gen marcador extraño que se ha introducido en un individuo.

10 Además, debe comprenderse que un "homólogo de un gen marcador" se refiere a un gen obtenido de especies que no sean el ser humano, que pueda hibridar como una sonda con un gen marcador humano en condiciones rigurosas. Tales condiciones rigurosas son conocidas para un experto en la materia, quien puede seleccionar una condición apropiada para producir una rigurosidad equivalente de forma experimental o empírica.

15 Puede utilizarse como un cebador o sonda un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de un gen marcador, o una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la cadena complementaria de la secuencia de nucleótidos de un gen marcador, y tiene al menos 15 nucleótidos. Por lo tanto, una "cadena complementaria" significa una cadena de un ADN bicatenario con respecto a la otra cadena y que consta de parejas de bases A:T (U para ARN) y G:C.

20 Además, "complementaria" significa no solo las que son completamente complementarias con una región de al menos 15 nucleótidos continuos, sino también las que tienen una homología de secuencia de nucleótidos de al menos el 40 % en determinados casos, el 50 % en determinados casos, el 60 % en determinados casos, el 70 % en determinados casos, el 80 % en determinados casos, el 90 % en determinados casos y el 95 % en determinados casos, o más elevado. El grado de homología entre secuencias de nucleótidos se puede determinar mediante un algoritmo, BLAST, etc.

25 Tales polinucleótidos son útiles como sonda para detectar un gen marcador, o como un cebador para amplificar un gen marcador. Cuando se utiliza como un cebador, el polinucleótido comprende normalmente de 15 pb a 100 pb, y en determinadas realizaciones de 15 pb a 35 pb de nucleótidos. Cuando se utiliza como una sonda, un ADN comprende la secuencia de nucleótidos del gen marcador completa (o la cadena complementaria del mismo), o una  
30 secuencia parcial del mismo que tiene al menos 15 pb de nucleótidos. Cuando se utiliza como un cebador, la región 3' debe ser complementaria con el gen marcador, mientras que la región 5' puede estar unida a un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción o a una etiqueta.

35 "Polinucleótidos" pueden ser ADN o ARN. Estos polinucleótidos pueden ser sintéticos o de origen natural. Además, normalmente el ADN utilizado como una sonda para hibridación está marcado. Los expertos en la materia comprenden fácilmente tales métodos de marcaje. En el presente documento el término "oligonucleótido" significa un polinucleótido con un grado relativamente bajo de polimerización. Los oligonucleótidos están incluidos en los polinucleótidos.

40 Las pruebas para un trastorno y/o enfermedad utilizando técnicas de hibridación se pueden realizar utilizando, por ejemplo, hibridación de Northern, hibridación por transferencia puntual o la técnica de micromatriz de ADN. Pueden utilizarse adicionalmente técnicas de amplificación de genes, tales como el método de RT-PCR. Mediante el uso del método de control por amplificación por PCR durante la etapa de amplificación de genes en la RT-PCR, se puede conseguir un análisis más cuantitativo de la expresión de un gen marcador.

45 En el método de control de la amplificación de genes por PCR, la diana de detección (ADN o transcripto inverso de ARN) se hibrida con sondas que están marcadas con un colorante fluorescente y un extintor que absorbe la fluorescencia. Cuando la PCR transcurre y la Taq polimerasa degrada la sonda con su actividad exonucleasa 5'-3', el colorante fluorescente y el extintor se apartan uno del otro y se detecta la fluorescencia. La fluorescencia se  
50 detecta en tiempo real. Mediante la medición simultánea de una muestra patrón en la que se conoce el número de copias de la diana es posible determinar el número de copias de la diana en una muestra del sujeto con un número de ciclos en donde la amplificación por PCR es lineal. Además, un experto en la materia reconoce que el método de control de la amplificación por PCR puede llevarse a cabo utilizando cualquier método adecuado.

55 El método para analizar una enfermedad relacionada con el cáncer también puede llevarse a cabo detectando una proteína que codifica un gen marcador. En lo sucesivo en el presente documento, una proteína codificada por un gen marcador se describe como un "proteína marcadora". Para tales métodos de prueba puede utilizarse por ejemplo el método de transferencia de Western, el método de inmunoprecipitación y el método de ELISA, utilizando un anticuerpo que se una a cada proteína marcadora.

60 Los anticuerpos utilizados en la detección que se unan a la proteína marcadora se pueden producir mediante cualquier técnica adecuada. Además, para detectar una proteína marcadora tal anticuerpo puede estar marcado de forma apropiada. Como alternativa, para detectar a la proteína marcadora de forma indirecta en lugar de marcar el anticuerpo se puede marcar una sustancia que se una de forma específica al anticuerpo, por ejemplo proteína A o  
65 proteína G. De forma más concreta, tal método de detección puede incluir el método de ELISA.

Se puede obtener una proteína o un péptido parcial de la misma utilizada como un antígeno, por ejemplo insertando un gen marcador o una porción del mismo en un vector de expresión, introduciendo la construcción en una célula hospedadora apropiada para producir un transformante, cultivando el transformante para expresar la proteína recombinante y purificando la proteína recombinante expresada a partir del cultivo o de sobrenadante del cultivo.

5 Como alternativa, se sintetiza de forma química para utilizarse como un inmunógeno la secuencia de aminoácidos que codifica un gen o un oligopéptido que comprende una porción de la secuencia de aminoácidos que codifica un ADNc de longitud completa.

Además, se puede realizar una prueba para una enfermedad relacionada con el cáncer utilizando como índice no solo el nivel de expresión de un gen marcador sino también la actividad de una proteína marcadora en una muestra biológica. La actividad de una proteína marcadora significa la actividad biológica intrínseca de la proteína. Para medir la actividad de cada proteína se pueden utilizar diversos métodos.

10

Incluso si un sujeto no está diagnosticado como afectado por una enfermedad y/o trastorno en una prueba de rutina, a pesar de los síntomas que sugieren estas enfermedades, se puede determinar de forma fácil si tal sujeto padece o no un trastorno y/o enfermedad realizando una prueba de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

15

De forma más concreta, en determinadas realizaciones cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento, un aumento o disminución del nivel de expresión del gen marcador en un sujeto cuyos síntomas sugieren al menos una susceptibilidad a un trastorno y/o enfermedad, indica que los síntomas principalmente están provocados de este modo.

20

Además, las pruebas son útiles para determinar si un trastorno y/o enfermedad mejora en un sujeto. En otras palabras, los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para juzgar el efecto terapéutico de un tratamiento a este efecto. Además, cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento, un aumento o disminución en el nivel de expresión del gen marcador en un sujeto, a quien se le ha diagnosticado que está afectado de este modo, implica que la enfermedad ha progresado.

25

La gravedad y/o susceptibilidad a un trastorno y/o enfermedad también se puede determinar a base de la diferencia en los niveles de expresión. Por ejemplo, cuando el gen marcador es uno de los genes descritos en el presente documento, el grado de aumento del nivel de expresión del gen marcador se correlaciona con la presencia y/o gravedad de un trastorno y/o enfermedad.

30

### 35 *Modelos animales*

También se pueden hacer modelos animales para un trastorno y/o una enfermedad donde el nivel de expresión de uno o más genes marcadores, o de un gen funcionalmente equivalente al gen marcador, se ha elevado en el modelo animal. Un "gen funcionalmente equivalente" como se utiliza en el presente documento en general es un gen que codifica una proteína que tiene una actividad similar a una actividad conocida de una proteína que codifica el gen marcador. Un ejemplo representativo de un gen funcionalmente equivalente incluye una contraparte de un gen marcador de un animal sujeto, que es intrínseco al animal.

40

El modelo animal es útil para detectar los cambios fisiológicos debidos a un trastorno y/o una enfermedad. En determinadas realizaciones, el modelo animal es útil para revelar funciones adicionales de los genes marcadores y para evaluar fármacos cuyas dianas son los genes marcadores.

45

Un modelo animal puede crearse mediante el control del nivel de expresión de un gen que sea contraparte o administrando un gen que sea contraparte. El método puede incluir crear un modelo animal controlando el nivel de expresión de un gen seleccionado del grupo de genes descritos en el presente documento. En otra realización, el método puede incluir crear un modelo animal administrando la proteína que codifica un gen descrito en el presente documento, o administrando un anticuerpo frente a la proteína. Debe comprenderse que, en determinadas otras realizaciones, el marcador puede tener expresión aumentada de modo que después el marcador puede medirse utilizando métodos apropiados. En otra realización, puede crearse un modelo animal introduciendo un gen seleccionado de tales grupos de genes, o administrando una proteína que codifica tal gen. En otra realización, se puede inducir un trastorno y/o enfermedad suprimiendo la expresión de un gen seleccionado de tales grupos de genes o la actividad de una proteína que codifica tal gen. Puede utilizarse para suprimir la expresión un ácido nucleico antisentido, una ribozima o un ARNi. La actividad de una proteína puede controlarse de forma eficaz administrando una sustancia que inhiba la actividad, tal como un anticuerpo.

50

55

60

El modelo animal es útil para esclarecer el mecanismo que subyace a un trastorno y/o enfermedad y también para probar la seguridad de los compuestos obtenidos mediante el cribado. Por ejemplo, cuando un modelo animal desarrolla los síntomas de un trastorno y/o enfermedad particular, o cuando se altera en el animal un valor medido implicado en determinado trastorno y/o enfermedad, se puede construir un sistema de cribado para cribar compuestos que tengan actividad para aliviar la enfermedad.

65

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “un aumento en el nivel de expresión” se refiere a uno cualquiera de los siguientes: donde un gen marcador introducido como un gen extraño se expresa de forma artificial; donde la transcripción de un gen marcador intrínseco al sujeto animal y la traducción del mismo a proteína está potenciada; o donde la hidrólisis de la proteína, que es un producto de traducción, está suprimida.

5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “una disminución del nivel de expresión” se refiere al estado en el que están inhibidas la transcripción de un gen marcador del animal sujeto y la traducción del mismo a proteína, o el estado en el que la hidrólisis de la proteína, que es el producto de traducción, está potenciada. El nivel de expresión de un gen se puede determinar, por ejemplo, mediante una diferencia de la intensidad de la señal en un chip de ADN. Además, la actividad de la proteína producto de traducción se puede determinar comparando con la del estado normal.

15 Esta también dentro del ámbito considerado que el modelo animal pueda incluir animales transgénicos, incluyendo, por ejemplo animales en donde un gen marcador se ha introducido y expresado de forma artificial; animales genosuprimidos para el gen marcador y animales genosustituídos en los que se ha sustituido otro gen por un gen marcador. Se puede utilizar como el animal transgénico un animal transgénico en el que se ha introducido un ácido nucleico antisentido de un gen marcador, una ribozima o un polinucleótido que tenga un efecto de ARNi, o se ha introducido un ADN que funcione como un ácido nucleico señuelo, etc. Tales animales transgénicos también incluyen, por ejemplo, animales en los que la actividad de una proteína marcadora se ha potenciado o suprimido introduciendo una mutación (o mutaciones) en la región codificante del gen, o la secuencia de aminoácidos se ha modificado para que se haga resistente o susceptible a la hidrólisis. Las mutaciones en una secuencia de aminoácidos incluyen sustituciones, deleciones, inserciones y adiciones.

*Ejemplos de expresión*

25 Además, la propia expresión de un gen marcador se puede controlar introduciendo una mutación (o mutaciones) en la región reguladora transcripcional del gen. Los expertos en la técnica comprenderán tales sustituciones de aminoácidos. Además, la cantidad de aminoácidos que se mutará no está particularmente restringida, siempre y cuando la actividad se mantenga. Normalmente, está dentro de 50 aminoácidos, en determinadas realizaciones no limitantes, dentro de 30 aminoácidos, dentro de 10 aminoácidos o dentro de 3 aminoácidos. El sitio de la mutación puede ser cualquier sitio, siempre y cuando la actividad se mantenga.

35 En aún otro aspecto, se proporcionan en el presente documento métodos de cribado para compuestos candidatos a ser agentes terapéuticos para tratar un trastorno y/o enfermedad particular. Se seleccionan uno o más genes marcadores a partir del grupo de genes descritos en el presente documento. Un agente terapéutico para una enfermedad relacionada con el cáncer puede obtenerse seleccionando un compuesto capaz de aumentar o disminuir el nivel de expresión del gen marcador (o genes marcadores).

40 Debe comprenderse que la expresión “un compuesto que aumenta el nivel de expresión de un gen” se refiere a un compuesto que promueve una cualquiera de las etapas de la transcripción de genes, la traducción de genes o la expresión de una actividad proteica. Por otro lado, la expresión “un compuesto que disminuye el nivel de expresión de un gen”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto que inhibe una cualquiera de estas etapas.

45 En aspectos particulares, el método de cribado para un agente terapéutico para un trastorno y/o enfermedad se puede llevar a cabo ya sea *in vivo* o *in vitro*. El método de cribado se puede realizar, por ejemplo, mediante:

- 1) la administración de un compuesto candidato a un sujeto animal;
- 2) la medición del nivel de expresión de un gen marcador (o genes marcadores) en una muestra biológica procedente del sujeto animal; o
- 3) la selección de un compuesto que aumente o disminuya el nivel de expresión de un gen marcador (o genes marcadores) en comparación con el de un control con el que el compuesto candidato no se ha puesto en contacto.

55 En todavía otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método para evaluar la eficacia de un compuesto candidato a ser un agente farmacéutico sobre el nivel de expresión de un gen marcador (o genes marcadores) poniendo en contacto un sujeto animal con el compuesto candidato y controlando el efecto del compuesto sobre el nivel de expresión del gen marcador (o genes marcadores) en una muestra biológica obtenida del sujeto animal. La variación del nivel de expresión del gen marcador (o genes marcadores) en una muestra biológica obtenida del sujeto animal se puede controlar utilizando la misma técnica que la utilizada en el método de análisis descrito anteriormente. Además, a base de la evaluación se puede seleccionar mediante cribado un compuesto candidato a ser un agente farmacéutico.

*Determinadas secuencias de bases nucleicas*

Las secuencias de bases nucleicas de miARN maduros y sus correspondientes secuencias tallo-bucle descritas en el presente documento son las secuencias encontradas en miRBase, una base de datos de búsqueda online de secuencias de miARN y de anotación, encontrada en <http://microrna.sanger.ac.uk/>. Las entradas en la base de datos miRBase Sequence representan una porción de una horquilla predicha de un transcrito de miARN (el tallo-bucle), con información del emplazamiento y la secuencia de la secuencia del miARN maduro. Las secuencias tallo-bucle de miARN en la base de datos no se restringen a miARN precursores (pre-miARN), y en algunos casos pueden incluir al pre-miARN y algo de la secuencia flanqueante procedente del transcrito primario presunto. Las secuencias de bases nucleicas de miARN descritas en el presente documento abarcan cualquier versión del miARN, incluyendo las secuencias descritas en Release 10.0 de la base de datos de secuencias miRBase y las secuencias descritas en cualquier publicación anterior de la base de datos de secuencias miRBase. Una publicación de una base de datos de secuencias puede dar como resultado el renombramiento de determinados miARN. Una publicación de una base de datos de secuencias puede dar como resultado una variación de una secuencia de un miARN maduro. Los compuestos que pueden abarcar tales oligonucleótidos modificados pueden ser complementarios a cualquier versión de la secuencia de bases nucleicas de los miARN descritos en el presente documento.

Se comprende que cualquier secuencia de bases nucleicas indicada en el presente documento es independiente de cualquier modificación en un residuo de azúcar, en una unión internucleósido o en una base nucleica. Se comprende adicionalmente que una secuencia de bases nucleicas que comprende U también comprende la misma secuencia de bases nucleicas en la que 'U' se reemplaza por 'T' en una o más posiciones que tengan 'U'. Por el contrario, se comprende que una secuencia de bases nucleicas que comprende T también abarca la misma secuencia de bases nucleicas en la que 'T' está reemplazada por 'U' en una o más posiciones que tengan 'T'.

En determinadas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de bases nucleicas que es complementaria con un miARN o un precursor del mismo, lo que significa que la secuencia de bases nucleicas de un oligonucleótido modificado es al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica al complemento de un miARN o precursor del mismo a lo largo de una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más bases nucleicas, o que las dos secuencias hibridan en condiciones de hibridación rigurosas. Por consiguiente, en determinadas realizaciones la secuencia de bases nucleicas de un oligonucleótido modificado puede tener una o más parejas de bases desapareadas con respecto a su miARN diana o secuencia precursora de miARN diana, o tiene la capacidad de hibridar con su secuencia diana. En determinadas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de bases nucleicas que es el 100 % complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En determinadas realizaciones, la secuencia de bases nucleicas de un oligonucleótido modificado tiene complementariedad de longitud completa con un miARN.

*Terapias de miARN (miR)*

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona microARN que inhiben la expresión de uno o más genes en un sujeto. Los perfiles de expresión del microARN pueden servir como una nueva clase de biomarcadores para el cáncer.

Se incluyen en el presente documento métodos para inhibir la expresión y/o la actividad de genes utilizando uno o más MiR. En determinadas realizaciones, el miR (o los miR) inhibe la expresión de una proteína. En otras realizaciones, el miARN (o los miARN) inhibe la actividad de genes (por ejemplo, actividad de invasión celular).

El miARN se puede aislar a partir de células o tejidos, producir de forma recombinante o sintetizar *in vitro* mediante diversas técnicas bien conocidas para un experto en la materia. En una realización, el miARN se aísla a partir de células o tejidos. Las técnicas para aislar miARN a partir de células o tejidos son bien conocidas para alguien con la experiencia habitual en la técnica. Por ejemplo, se puede aislar miARN a partir del ARN total utilizando el kit de aislamiento de miARN mirVana de Ambion Inc. Otra técnica utiliza el sistema Fractionator System flashPAGE™ (Ambion, Inc.) para purificación por PAGE de ácidos nucleicos pequeños.

Para el uso de la terapia por miARN, alguien con la experiencia habitual en la materia comprende que los ácidos nucleicos administrados *in vivo* se captan y distribuyen a las células y tejidos.

El ácido nucleico se puede entregar de una manera adecuada que permita la captación específica de tejido del sistema de entrega del agente y/o ácido nucleico. Las formulaciones descritas en el presente documento pueden complementar condiciones de tratamiento por cualquier terapia convencional conocida, que incluye, pero sin limitación, administración de anticuerpos, administración de vacunas, administración de agentes citotóxicos, polipéptidos de aminoácidos naturales, ácidos nucleicos, análogos de nucleótido y modificadores de la respuesta biológica. Se pueden utilizar dos o más compuestos combinados juntos o de forma secuencial.

Determinadas realizaciones de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más ácidos nucleicos o compuestos de molécula pequeña y (b) uno o más agentes quimioterápicos.



*Definiciones útiles adicionales*

- 5 “Sujeto” significa un ser humano o un animal que no sea ser humano seleccionado para el tratamiento o terapia. “Sujeto que se sospecha que tiene” significa un sujeto que presenta uno o más indicadores clínicos de un trastorno, enfermedad o afección.
- 10 “Prevenir” o “prevención” se refiere al retraso o impedimento del inicio, desarrollo o evolución de una afección o enfermedad durante un período de tiempo, incluyendo semanas, meses o años. “Tratamiento” o “tratar” significa la aplicación de uno o más procedimientos específicos utilizados para la cura o mejora de un trastorno y/o enfermedad. En determinadas realizaciones, el procedimiento específico es la administración de uno o más agentes farmacéuticos.
- 15 “Mejora” significa una disminución de la gravedad de al menos un indicador de una afección o enfermedad. En determinadas realizaciones, la mejora incluye un retraso o entecimiento de la evolución de uno o más indicadores de una afección o enfermedad. La gravedad de los indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas que son conocidas para los expertos en la materia.
- 20 “Sujeto que lo necesite” significa un sujeto que se ha identificado que necesita una terapia o tratamiento.
- “Administrar” significa proporcionar un agente o composición farmacéutica a un sujeto, e incluye, pero sin limitación, la administración por un profesional médico y la autoadministración.
- 25 “Administración parenteral” significa la administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye, pero sin limitación, administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intrarterial y administración intracraneal. “Administración subcutánea” significa la administración justo debajo de la piel.
- 30 “Función mejorada” significa los cambios que funcionan hacia los parámetros normales. En determinadas realizaciones, la función se evalúa midiendo moléculas encontradas en los fluidos corporales del sujeto. “Composición farmacéutica” significa una mezcla de sustancias adecuadas que incluye un agente farmacéutico para la administración a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender un oligonucleótido modificado y una solución acuosa estéril.
- 35 “Ácido nucleico diana”, “ARN diana”, “transcrito de ARN diana” y “diana de ácido nucleico” significan todas un ácido nucleico que tiene la capacidad de ser objetivo de compuestos antisentido. “Que se dirige a” significa el proceso de diseño y selección de una secuencia de bases nucleicas que hibridará con un ácido nucleico diana e inducirá un efecto deseado. “Dirigido a” significa que tiene una secuencia de bases nucleicas que permitirá la hibridación con un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado. En determinadas realizaciones, un efecto deseado es la reducción de un ácido nucleico diana.
- 40 “Modulación” significa una perturbación de una función o actividad. En determinadas realizaciones, modulación significa un aumento de la expresión de genes. En determinadas realizaciones, modulación significa una disminución de la expresión de genes.
- 45 “Expresión” significa cualquier función y etapa en la que una información que codifica un gen se convierte en estructuras presentes y operantes en una célula.
- 50 “Región” significa una porción de nucleosidos unidos dentro de un ácido nucleico. En determinadas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de bases nucleicas que es complementaria con una región de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, en determinadas tales realizaciones un oligonucleótido modificado es complementario con una región de una secuencia de tallo-bucle de miARN. En determinadas tales realizaciones, un oligonucleótido modificado es el 100 % idéntico a una región de una secuencia de miARN.
- 55 “Segmento” significa una subporción de una región o una región más pequeña.
- “Secuencia de bases nucleicas” significa el orden de bases nucleicas contiguas, en una orientación 5' a 3', independiente de cualquier azúcar, unión y/o modificación de base nucleica.
- 60 “Bases nucleicas contiguas” significa bases nucleicas inmediatamente adyacentes entre sí en un ácido nucleico.
- 65 “Complementariedad de bases nucleicas” significa la capacidad de dos bases nucleicas para emparejarse de forma no covalente a través de uniones hidrógeno. “Complementariedad” significa una primera secuencia de bases nucleicas que es al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica o es el 100 % idéntica, al complemento de una segunda secuencia de bases nucleicas a lo largo de una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más bases nucleicas, o que las dos secuencias hibridan en condiciones de hibridación rigurosas. En determinadas

realizaciones un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de bases nucleicas que es el 100 % complementaria a un miARN, o un precursor del mismo, puede no ser el 100 % complementario al miARN, o un precursor del mismo, a lo largo de la longitud entera del oligonucleótido modificado.

5 “Complementariedad” significa la capacidad de emparejamiento de bases nucleicas entre un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico. “Complementariedad de longitud completa” significa que cada base nucleica de un primer ácido nucleico tiene la capacidad de emparejarse con cada base nucleica en una correspondiente posición en un segundo ácido nucleico. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un oligonucleótido modificado en el que cada base nucleica tiene complementariedad con una base nucleica en un miARN tiene complementariedad de  
10 longitud completa con el miARN.

“Complementariedad porcentual” significa el número de bases nucleicas complementarias en un ácido nucleico dividido por la longitud del ácido nucleico. En determinadas realizaciones, complementariedad porcentual de un oligonucleótido modificado significa el número de bases nucleicas que son complementarias con el ácido nucleico  
15 diana, dividido por el número de bases nucleicas del oligonucleótido modificado. En determinadas realizaciones, complementariedad porcentual de un oligonucleótido modificado significa el número de bases nucleicas que son complementarias con un miARN, dividido por el número de bases nucleicas del oligonucleótido modificado.

“Región unida porcentual” significa el porcentaje de una región complementaria con una región de un oligonucleótido. La región unida porcentual se calcula dividiendo el número de bases nucleicas de la región diana que es complementaria con el oligonucleótido por la longitud de la región diana. En determinadas realizaciones, la  
20 región unida porcentual es al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 100 %.

25 “Identidad porcentual” significa el número de bases nucleicas en el primer ácido nucleico que es idéntico a las bases nucleicas en las posiciones correspondientes en un segundo ácido nucleico, dividido por el número total de bases nucleicas en el primer ácido nucleico.

30 “Sustancialmente idéntico” utilizado en el presente documento puede significar que una primera y una segunda secuencia de bases nucleicas son al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas, o el 100 % idénticas, a lo largo de una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más bases nucleicas.

35 “Hibridar” significa el apareamiento de ácidos nucleicos complementarios que se produce a través de la complementariedad de bases nucleicas.

“Desapareamiento” significa una base nucleica de un primer ácido nucleico que no tiene la capacidad de emparejarse con una base nucleica en una correspondiente posición de un segundo ácido nucleico.

40 “Base nucleica no complementaria” significa dos bases nucleicas que no tienen la capacidad de emparejarse a través de uniones hidrógeno.

“Idéntico” significa que tiene la misma secuencia de bases nucleicas.

45 “miARN” o “miR” significa un ARN no codificante de entre 18 y 25 bases nucleicas de longitud que hibridan con y regulan la expresión de un ARN codificante. En determinadas realizaciones, un miARN es el producto de escisión de un pre-miARN mediante la enzima Dicer. Los ejemplos de miARN se encuentran en la base de datos de miARN conocida como miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).

50 “Pre-miARN” o “pre-miR” significa un ARN no codificante que tiene una estructura en horquilla, que contiene un miARN. En determinadas realizaciones, un pre-miARN es el producto de escisión de un pri-miR mediante la ribonucleasa específica de ARN bicatenario conocido como Drosha.

55 “Secuencia tallo-bucle” significa un ARN que tiene una estructura en horquilla y que contiene una secuencia de miARN madura. Las secuencias pre-miARN y las secuencias tallo-bucle pueden solapar. Los ejemplos de secuencias tallo-bucle se encuentran en la base de datos de miARN conocida como miRBase ([microrna.sanger.ac.uk/](http://microrna.sanger.ac.uk/)).

60 “Precursor de miARN” significa un transcrito que se origina a partir de un ADN genómico y que comprende un ARN no codificante estructurado que comprende una o más secuencias de miARN. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un precursor de miARN es un pre-miARN. En determinadas realizaciones, un precursor de miARN es un pri-miARN.

65 “Compuesto antisentido” significa un compuesto que tiene una secuencia de bases nucleicas que permitirá la hibridación con un ácido nucleico diana. En determinadas realizaciones, un compuesto antisentido es un oligonucleótido que tiene una secuencia de bases nucleicas complementaria con un ácido nucleico diana.

“Oligonucleótido” significa un polímero de nucleósidos unidos, cada uno de los cuales puede estar modificado o no modificado, independiente uno del otro. “Unión internucleósidos de origen natural” significa una unión 3’ a 5’ fosfodiéster entre nucleósidos. “Base nucleica natural” significa una base nucleica que no está modificada con respecto a su forma de origen natural. “Antagonista de miR” significa un agente diseñado para interferir con o inhibir la actividad de un miARN. En determinadas realizaciones, un antagonista de miR comprende un compuesto antisentido que se dirige a un miARN. En determinadas realizaciones, un antagonista de miR comprende un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de bases nucleicas que es complementaria con la secuencia de bases nucleicas de un miARN, o con un precursor de la misma. En determinadas realizaciones, un antagonista de miR comprende una molécula pequeña, o similar, que interfiere con o inhibe la actividad de un miARN.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES BASADOS EN MICROARN PARA EL DIAGNÓSTICO, EL PRONÓSTICO Y EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS RELACIONADOS CON LA PRÓSTATA

<130> 53-29927

<140>  
<141>

<150> 61/067.518  
<151> 28-02-2008

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 1  
caagagctct ttgtcctgg 19

<210> 2  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 2  
agcccacctt ctgtcctcg 19

<210> 3  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 3  
agacggagtc ttgttctgt 19

<210> 4  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

# ES 2 600 165 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 4  
ctaaataaga ttgttcta 19

<210> 5  
<211> 19  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 5  
caggacaat ttgttattc 19

<210> 6  
20 <211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 6  
ttacaaatat gtgttcttt 19

<210> 7  
30 <211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 7  
ctttttag atgttctgg 19

<210> 8  
40 <211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 8  
50 actgtcatga gtgttctga 19

<210> 9  
<211> 19  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

60 <400> 9  
caggtctca gtgcctcc 19

<210> 10  
<211> 19  
65 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

## ES 2 600 165 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 10  
gtggtgcttt ttgtgttg 19

<210> 11  
<211> 19  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 11  
tgggaactta gagtctca 19

<210> 12  
<211> 19  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 12  
gatgggcatc ttgtccccg 19

<210> 13  
<211> 19  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 13  
ggacctaggt gtgttctca 19

<210> 14  
<211> 19  
40 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

50 <400> 14  
agctttcttg cggtcctt 19

<210> 15  
<211> 19  
55 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

60 <400> 15  
cagtttattt ttgttctcc 19

<210> 16  
<211> 19  
65 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

## ES 2 600 165 T3

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5      <400> 16  
          aaagattgta ctgttctct                      19

<210> 17  
 <211> 19  
 10      <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15      <400> 17  
          cttactctg atgttcttt                      19

<210> 18  
 <211> 19  
 20      <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25      <400> 18  
          acggggccac ggtccttc                      19

<210> 19  
 <211> 19  
 30      <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35      <400> 19  
          acagggccat ggtcctgg                      19

40      <210> 20  
          <211> 15  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

45      <220>  
          <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (3)..(3)  
 <223> a, c, g, t desconocido u otro

50      <220>  
          <221> base\_modificada  
          <222> (7)..(8)  
          <223> a, c, g, t desconocido u otro

<400> 20  
 60      rgnacrnngt gttct                      15

<210> 21  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 65      <213> Secuencia artificial

## ES 2 600 165 T3

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5     <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> (2)..(2)  
       <223> a, c, g, t desconocido u otro

10    <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> (7)..(8)  
       <223> a, c, g, t desconocido u otro

15    <400> 21  
       dnwcnwntng tyct                   14

20    <210> 22  
       <211> 15  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

25    <220>  
       <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30    <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> (3)..(3)  
       <223> a, c, g, t desconocido u otro

35    <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> (6)..(7)  
       <223> a, c, g, t desconocido u otro

40    <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> (9)..(9)  
       <223> a, c, g, t desconocido u otro

45    <400> 22  
       rgnacnknt gttct                   15

50    <210> 23  
       <211> 15  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

55    <220>  
       <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

60    <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> (7)..(9)  
       <223> a, c, g, t desconocido u otro

65    <400> 23  
       ggtwcwnnt gttct                   15

60    <210> 24  
       <211> 15  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

65    <220>  
       <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (8)..(9)  
<223> a, c, g, t desconocido u otro

5

<400> 24  
rgaacasnnt gttct 15



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un producto del gen miR-32 aislado que comprende un antagonista de miR para aumentar la respuesta de células de cáncer de próstata a estímulos apoptóticos, en donde el antagonista de miR comprende una secuencia de oligonucleótido complementaria a miR-32, o un precursor del mismo.
- 10 2. Uso del producto del gen miR-32 aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica comprende adicionalmente al menos un agente antineoplásico seleccionado de uno o más de doxorubicina y etopósido.
- 15 3. Uso del producto del gen miR-32 aislado de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde las células de cáncer de próstata son de mamífero.
4. Uso del producto del gen miR-32 aislado de acuerdo con la reivindicación 3, en donde las células de cáncer de próstata son humanas.

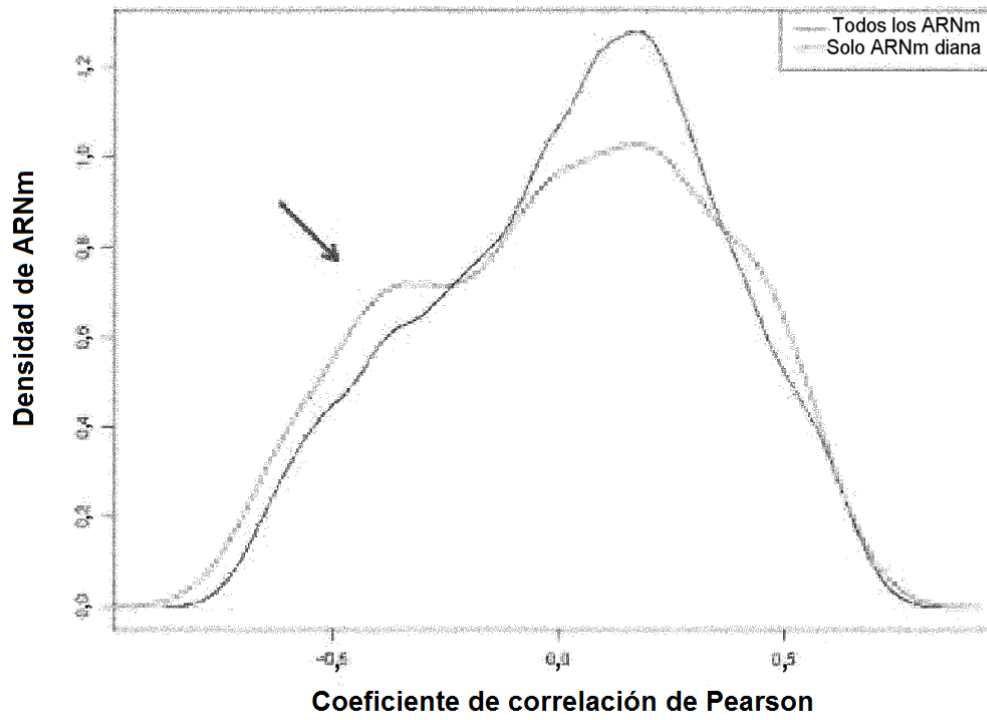


Fig. 1A

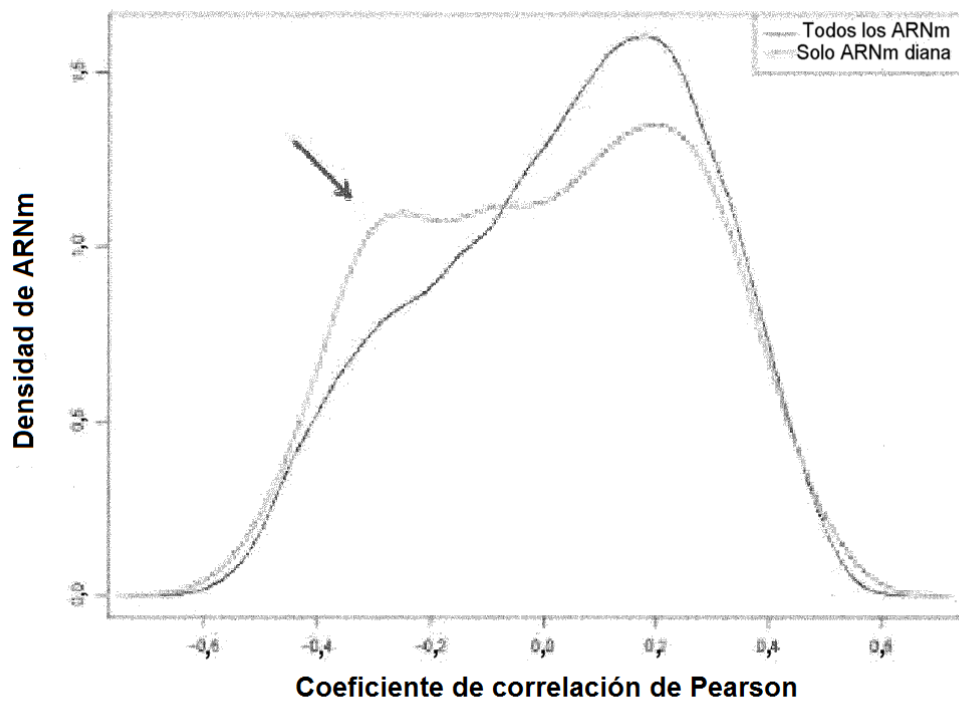


Fig. 1B

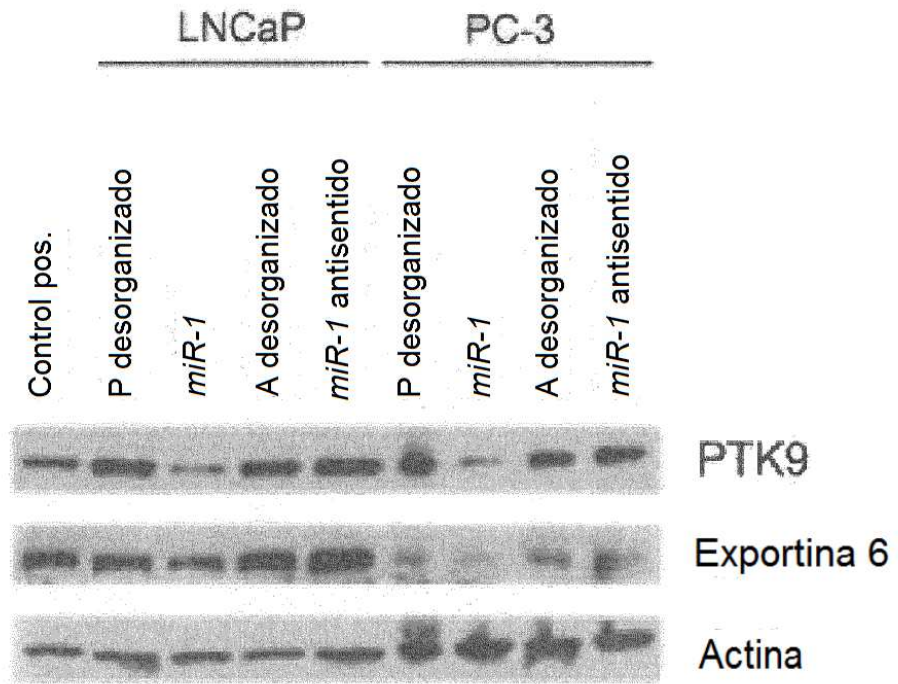


Fig. 2A

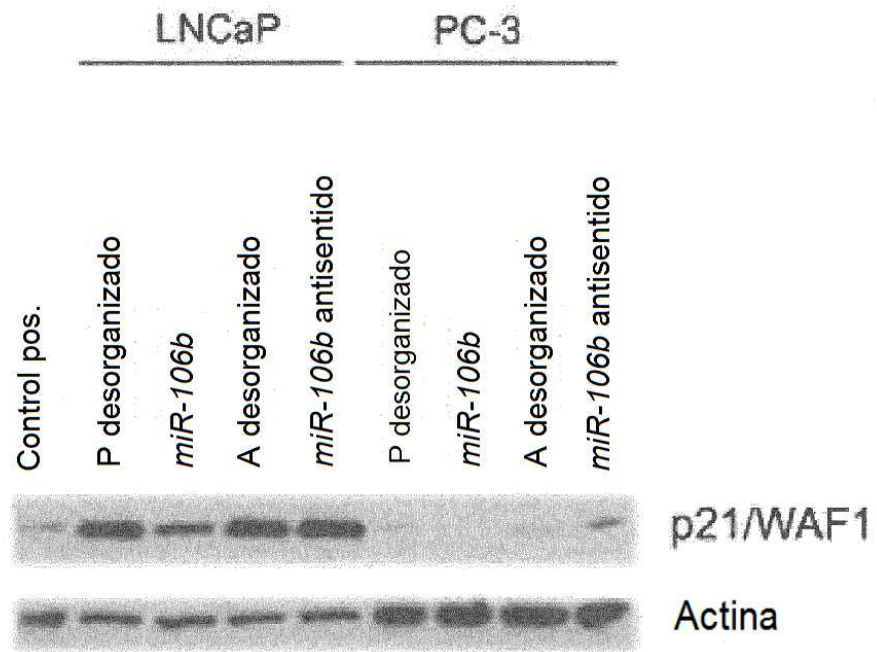


Fig. 2B

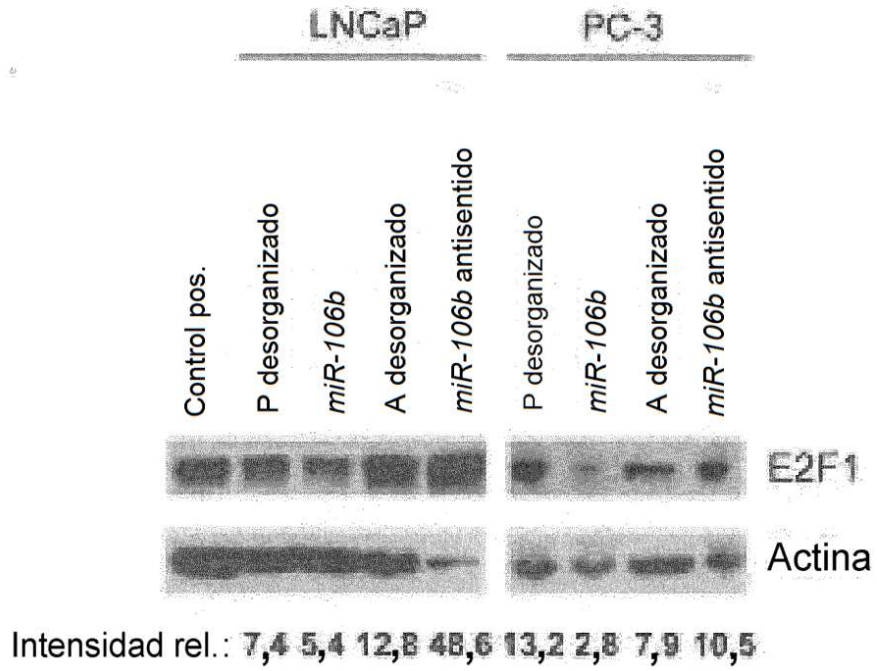


Fig. 3A

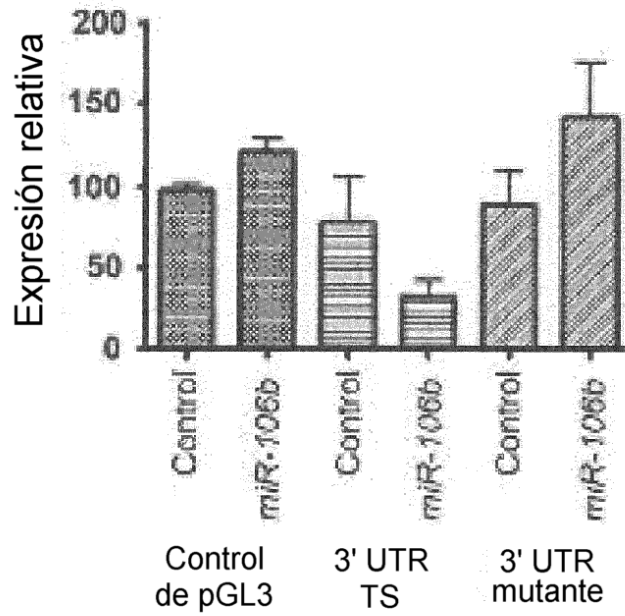


Fig. 3B

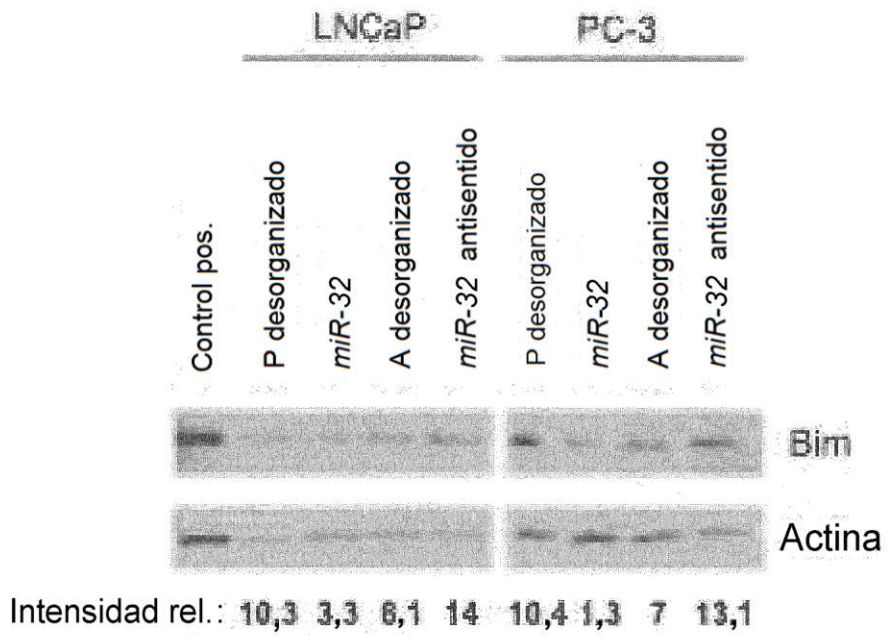


Fig. 3C

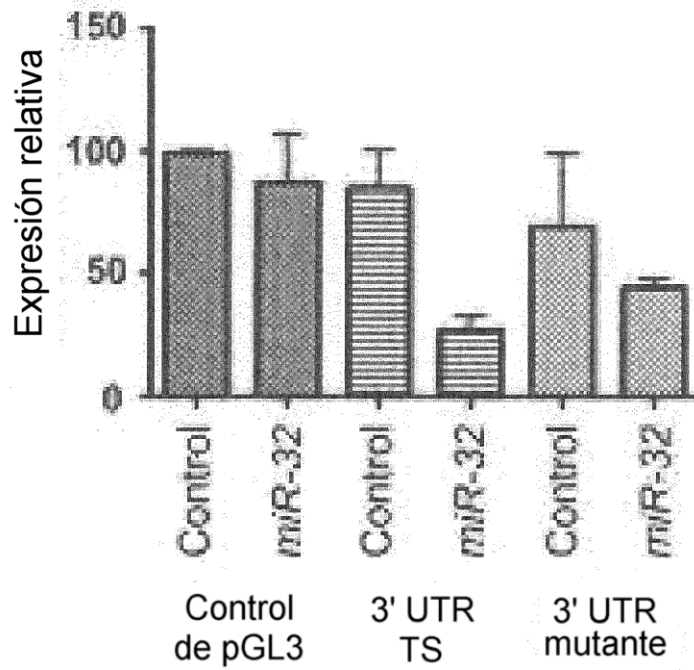


Fig. 3D

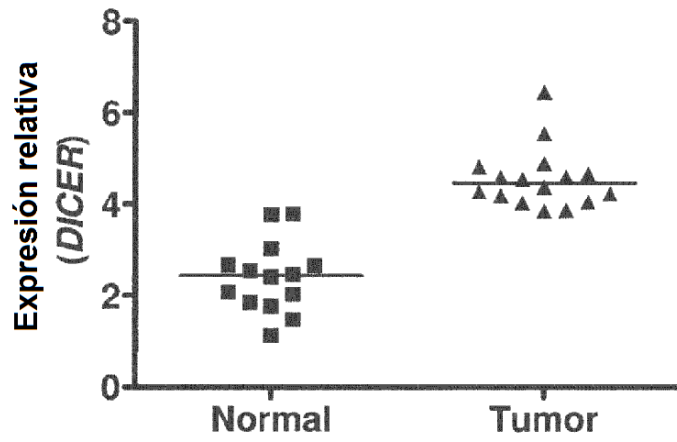


Fig. 4A

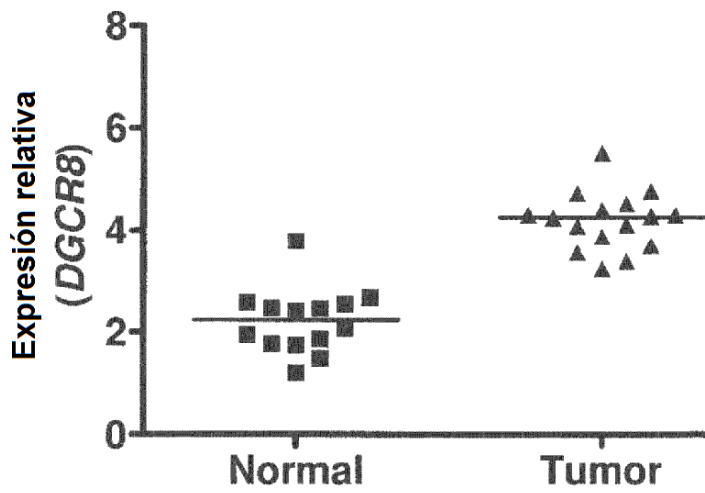


Fig. 4B

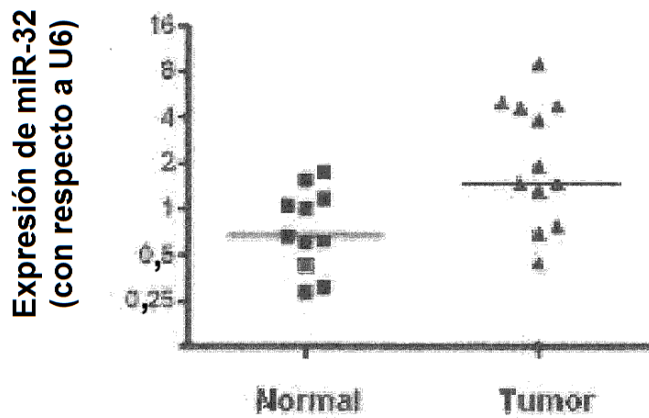


Fig. 5A

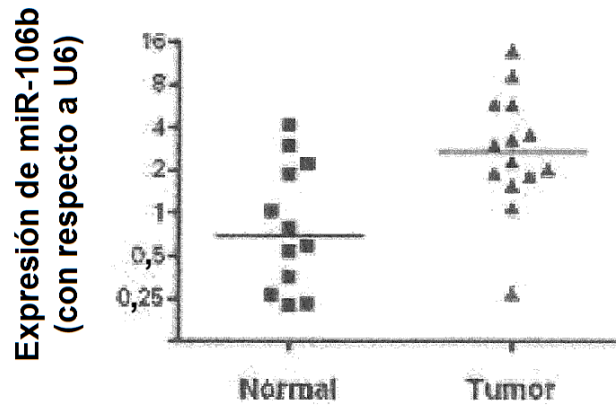


Fig. 5B

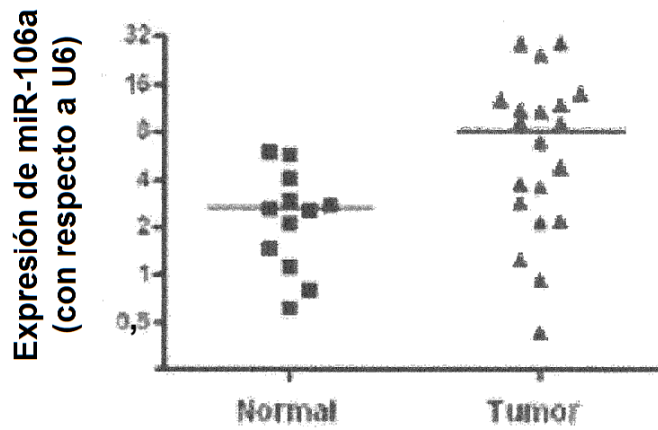


Fig. 5C

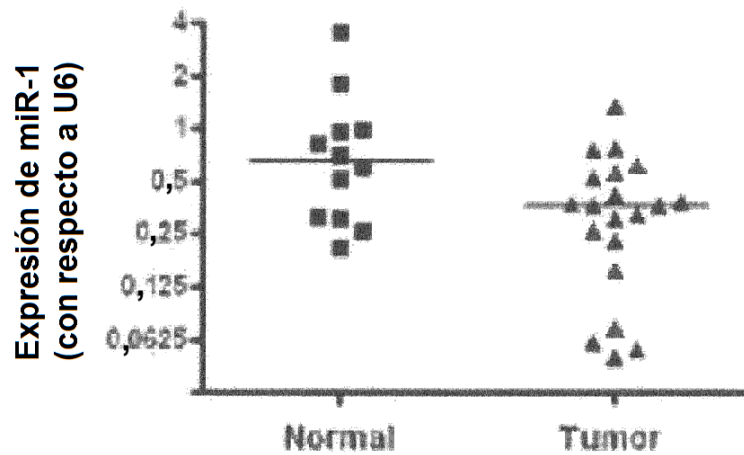


Fig. 5D

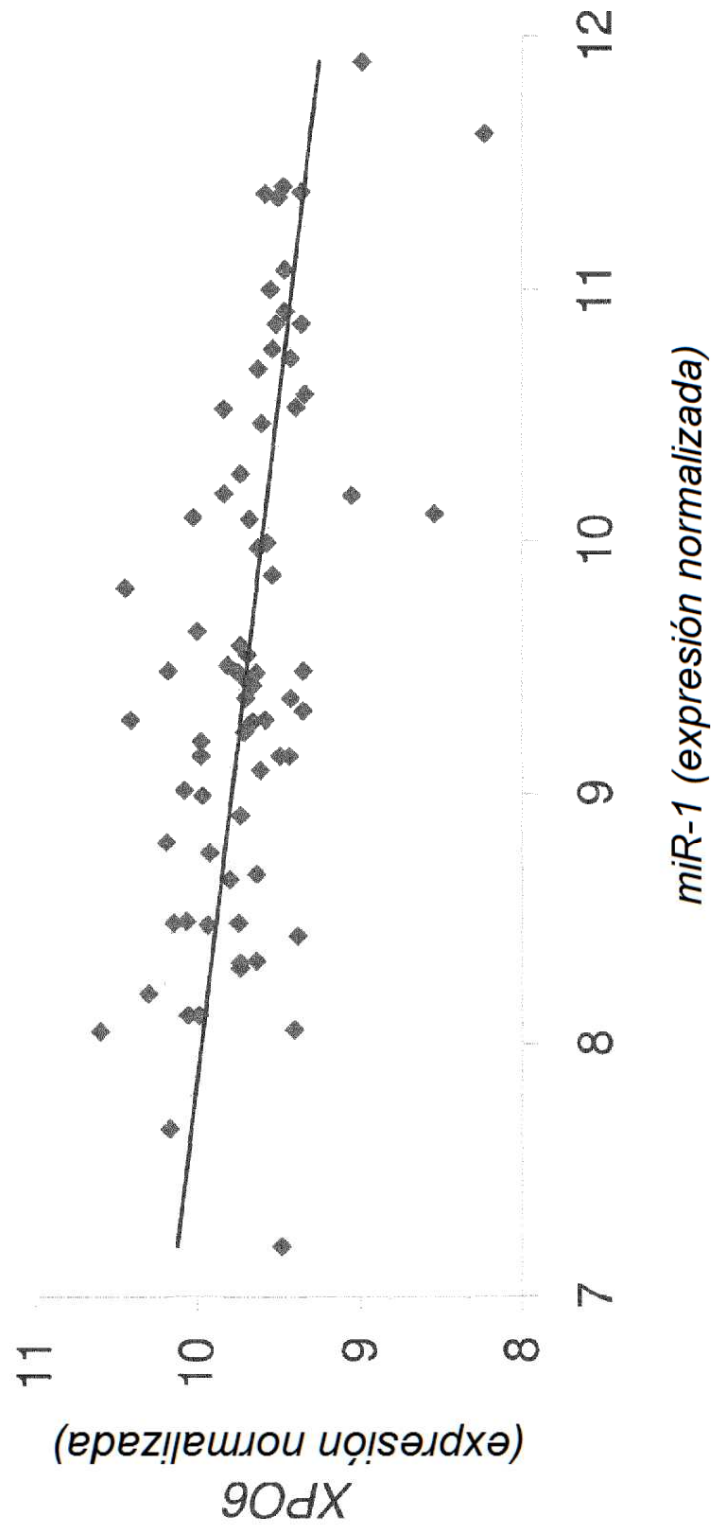


Fig. 6



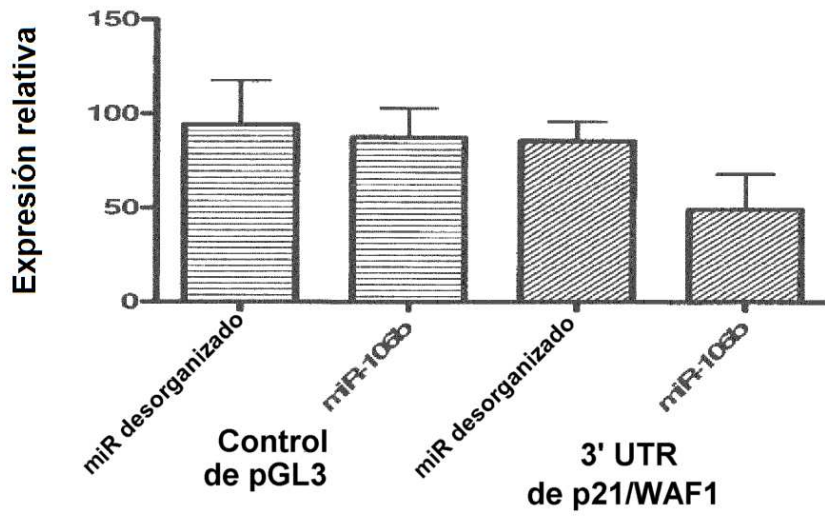


Fig. 7

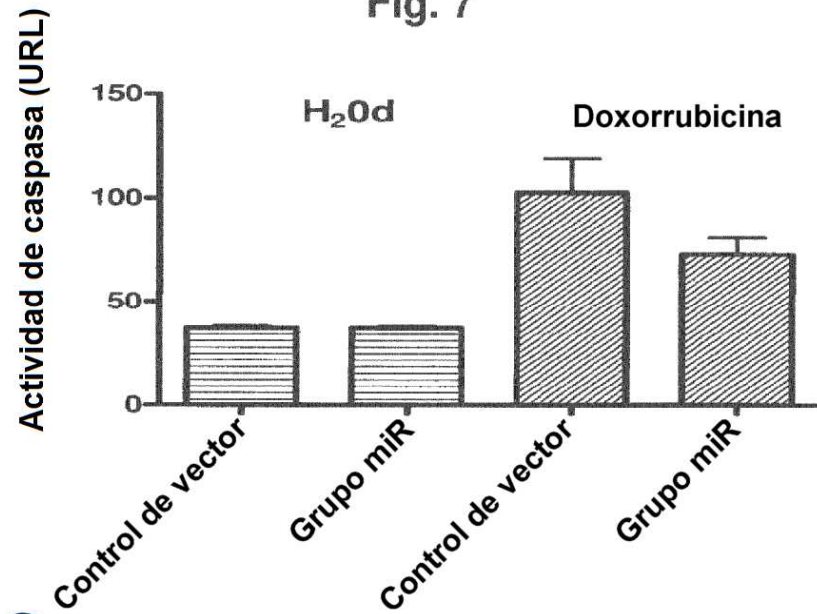


Fig. 8A

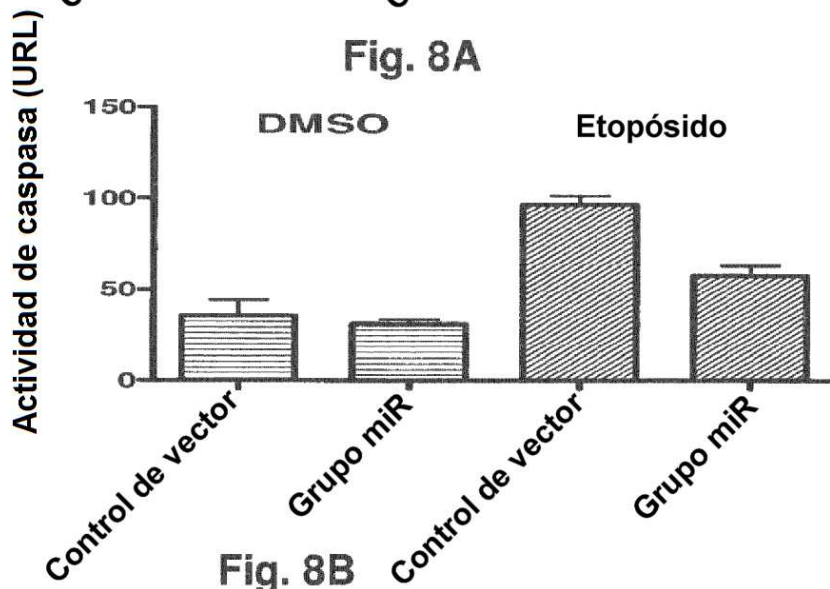


Fig. 8B

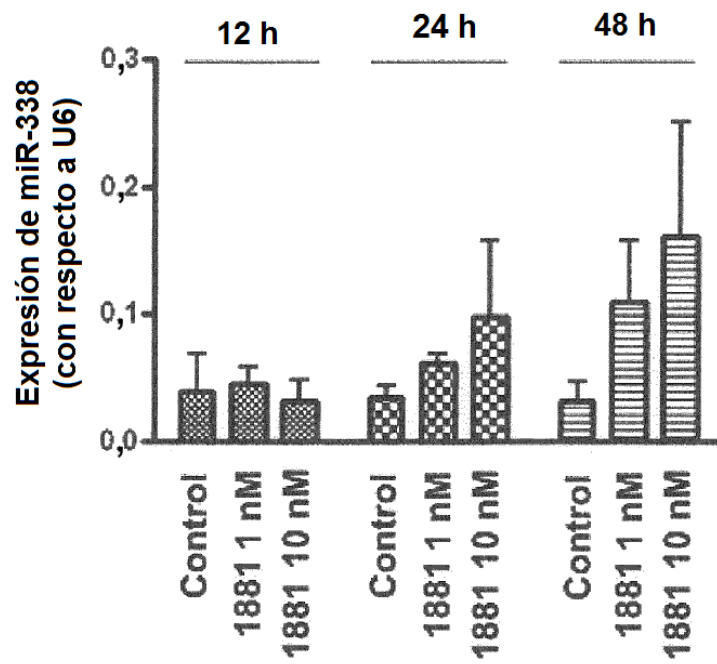


Fig. 9A

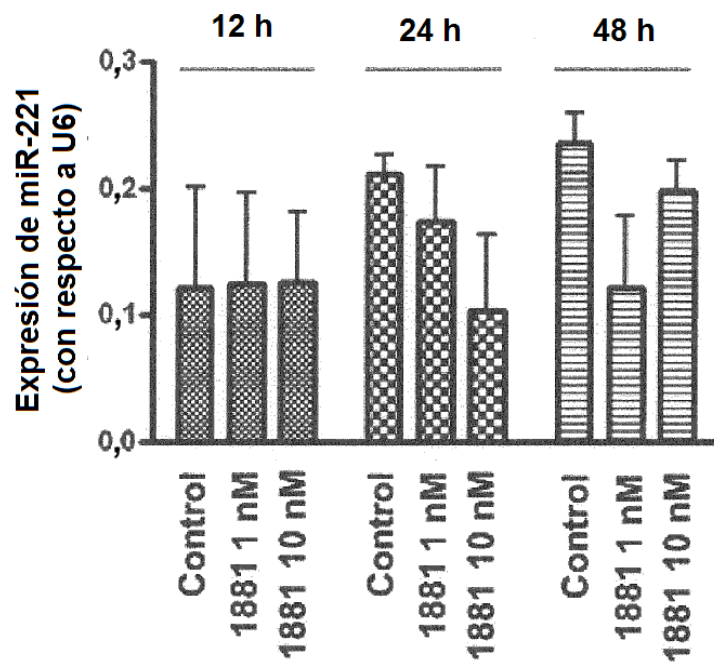


Fig. 9B

<b>Tabla 1: Características clínicas de la población de estudio</b>				
	<b>Todos los casos (n = 60)</b>	<b>Afroamericanos (n = 30)</b>	<b>Euroamericanos (n = 30)</b>	<b>Prueba t valor P<sup>2</sup></b>
<b>Edad en el momento de la prostatectomía Mediana (intervalo) n = 60</b>	60 (47 -73)	61 (48 - 72)	60 (47 - 73)	0,91
<b>de PSA en el momento del diagnóstico Mediana (intervalo) n = 44<sup>1</sup></b>	6,1 (1,3 - 47,7)	6,0 (1,3 - 47,7)	6,1 (4,0 - 20,0)	0,67
<b>Nódulo individual más grande (gramos) Mediana (intervalo) n = 51<sup>1</sup></b>	1,6 (0,2 -2,9)	1,5 (0,8-2,9)	1,6 (0,2 - 2,8)	0,78
<b>Fuente del tejido NCI CPCTR Universidad de Maryland</b>	N (%)	N (%)	N (%)	<b>Prueba exacta de Fisher</b>
	52 (87) 8 (13)	27 (90) 3 (10)	25 (83) 5 (17)	
				0,71
<b>Puntuación suma de Gleason &lt; 7(5-6) ≥ 7 (7-9)</b>	15 (25) 45 (75)	8 (27) 22 (73)	7(23) 23 (77)	1,0
<b>Extensión extraprostática<sup>1</sup> No Sí</b>	35 (67) 17 (33)	19 (70) 8 (30)	16 (64) 9 (36)	0,77
<b>Estado del margen quirúrgico<sup>1</sup> Negativo Positivo</b>	30 (59) 21 (41)	17 (63) 10 (37)	13 (54) 11 (46)	0,58
<b>Invasión de la vesícula seminal<sup>1</sup> No Sí</b>	43 (83) 9 (17)	20 (74) 7 (26)	23 (92) 2 (8)	0,14
<sup>1</sup> No se incluyen los casos con estado desconocido. <sup>2</sup> Valor P para la diferencia entre afroamericanos y euroamericanos				

**Fig. 10**

Tabla 2: microARN expresados de forma diferencial entre tejido tumoral y no tumoral*					
Regulado de forma positiva en tumores			Regulado de forma negativa en tumores		
Nombre de miR	Cambio en veces	Emplazamiento cromosómico	Nombre de miR	Cambio en veces	Emplazamiento cromosómico
<i>miR-32</i>	2,1	9q31.3	<i>miR-520h</i>	0,3	19q13.42
<i>miR-182</i>	1,9	7q32.2	<i>miR-494</i>	0,4	14q32.31
<i>miR-31</i>	1,8	9p21.3	<i>miR-490</i>	0,4	7q33
<i>miR-26a-1/2</i>	1,8	3p22.3/12q14.1	<i>miR-133a-1</i>	0,5	18q11.2
<i>miR-200c</i>	1,7	12p13.31	<i>miR-1-2</i>	0,6	18q11.2
<i>miR-375</i>	1,6	2q35	<i>miR-218-2</i>	0,6	5q34
<i>miR-196a-U2</i>	1,6	17q21.32/12q13.13	<i>miR-220</i>	0,6	Xq25
<i>miR-370</i>	1,6	14q32.31	<i>miR-128a</i>	0,6	2q21.3
<i>miR-425</i>	1,6	3p21.31	<i>miR-221</i>	0,7	Xp11.3
<i>miR-194-1/2</i>	1,5	1q41/11q13.1	<i>miR-499</i>	0,7	20q11.22
<i>miR-181a-1/2</i>	1,5	1q31.3/9q33.3	<i>miR-329</i>	0,7	14q32.31
<i>miR-34b</i>	1,5	11q23.1	<i>miR-340</i>	0,7	5q35.3
<i>let-7i</i>	1,5	12q14.1	<i>miR-345</i>	0,7	14q32.2
<i>miR-188</i>	1,4	Xp11.22	<i>miR-410</i>	0,7	14q32.31
<i>miR-25</i>	1,4	7q21.11	<i>miR-126</i>	0,7	9q34.3
<i>miR-106b</i>	1,4	7q21.11	<i>miR-205</i>	0,8	1q32.2
<i>miR-449</i>	1,4	5q11.2	<i>miR-7-1/2</i>	0,8	9q21.33/15q26.1
<i>miR-99b</i>	1,4	19q13.41	<i>miR-145</i>	0,8	5q32
<i>miR-93</i>	1,3	7q21.11	<i>miR-34a</i>	0,8	1p36.22
<i>miR-92-1/2</i>	1,3	13q31.3/ Xq26.2	<i>miR-487</i>	0,8	14q32.31
<i>miR-125a</i>	1,3	19q13.41	<i>let-7b</i>	0,8	22q13.31

\* FDR < 5 % y valor *P* (prueba t) < 0,01 para todos los microARN; Cambio en veces: la referencia es tejido no tumoral

Fig. 11

<b>Tabla 3: microARN asociados a enfermedad extraprostática</b>			
<b>Nombre del gen</b>	<b>Cambio en veces*</b>	<b>FDR</b>	<b>Emplazamiento cromosómico</b>
<i>miR-101-1/2</i>	1,6	<1 %	1p31.3/9p24.1
<i>miR-200a</i>	1,6	10 % al 15 %	1p36.33
<i>miR-200b</i>	1,6	10 % al 15 %	1p36.33
<i>miR-196a-l/2</i>	1,3	10 % al 15 %	17q21.32/12q13.13
<i>miR-30c-l/2</i>	1,3	10 % al 15 %	1p34.2/6q13
<i>miR-484</i>	1,3	10 % al 15 %	16p13.11
<i>miR-99b</i>	1,3	10 % al 15 %	19q13.41
<i>miR-186</i>	1,3	10 % al 15 %	1p31.1
<i>miR-195</i>	1,3	10 % al 15 %	17p13.1
<i>Let-7f-2</i>	1,3	10 % al 15 %	Xp11.22
<i>miR-34c</i>	1,2	10 % al 15 %	11q23.1
<i>miR-371</i>	0,7	15 % al 20 %	19q13.42
<i>miR-373</i>	0,7	10 % al 15 %	19q13.42
<i>miR-410</i>	0,7	15 % al 20 %	14q32.31
<i>miR-491</i>	0,7	15 % al 20 %	9p21.3
* Comparación de tumores con y sin (referencia) extensión extraprostática. Valor <i>P</i> (prueba t) < 0,01 para todos los microARN			

Fig. 12

<b>Tabla 4A: Correlación inversa entre <i>miR-1</i> y los niveles de transcrito del gen diana en tumores de próstata</b>				
Nombre del gen	N.º ID del GenBank	N.º ID Affy	Conjunto de sondas <i>miR-1</i> 7 7 1	Conjunto de sondas <i>miR-1</i> 7 8 1
			Coeficiente de correlación de Pearson (intervalo de confianza del 95 %)	
<i>WDR6</i>	NM_018031	217734_s_at	-0,57 (-0,43 a -0,68)	-0,57 (-0,43 a -0,68)
<i>XPO6</i>	NM_015171	214784_x_at	-0,57 (-0,43 a -0,68)	-0,53 (-0,38 a -0,65)
<i>SMARCA4</i>	NM_003072	214728_x_at	-0,55 (-0,41 a -0,67)	-0,54 (-0,40 a -0,66)
		213720_s_at	-0,49 (-0,33 a -0,62)	-0,47 (-0,31 a -0,60)
		208794_s_at	-0,46 (-0,31 a -0,60)	-0,45 (-0,29 a -0,58)
<i>TNPO2</i>	NM_013433	221506_s_at	-0,50 (-0,35 a -0,63)	-0,50 (-0,35 a -0,63)
		221507_s_at	-0,32 (-0,14 a -0,47)	-0,32 (-0,14 a -0,47)
<i>TKT</i>	U55017	208700_s_at	-0,49 (-0,33 a -0,61)	-0,49 (-0,33 a -0,61)
<i>CTTNBP2NL</i>	AB037854	214731_at	-0,45 (-0,29 a -0,58)	-0,46 (-0,30 a -0,59)
<i>HNRPA1</i>	BF206515	214280_x_at	-0,44 (-0,28 a -0,58)	-0,43 (-0,26 a -0,57)
		222040_at	-0,23 (-0,05 a -0,40)	-0,21 (-0,03 a -0,39)
<i>AP3D1</i>	NM_003938	206592_s_at	-0,44 (-0,28 a -0,58)	-0,45 (-0,28 a -0,58)
<i>RNF40</i>	NM_194352	206845_s_at	-0,40 (-0,23 a -0,54)	-0,40 (-0,23 a -0,55)
<i>TRIM26</i>	BC024039	202702_at	-0,40 (-0,23 a -0,54)	-0,39 (-0,22 a -0,53)

**Nota: Genes mejor clasificados. La prueba de correlación de Pearson se realizó con los datos de micromatriz normalizados**

Fig. 13A

<b>Tabla 4B: Predictor de PAM de conjunto de 37 sondas para tumores de próstata</b>			
<b>Nombre del gen</b>	<b>ID del chip</b>	<b>Puntuación de PAM normal</b>	<b>Puntuación de PAM tumoral</b>
miR-1	7 7 1	0,0253	-0,0067
	7 8 1	0,0269	-0,0072
miR-31	15 3 2	-0,042	0,0112
miR-32	<b>25 1 1*</b>	-0,2276	0,0607
	<b>25 2 1*</b>	-0,2414	0,0644
miR-128a	3 7 1	0,0509	-0,0136
	3 8 1	0,007	-0,0019
miR-133a	17 13 1	0,0023	0,0006
	25 13 1	0,0319	-0,0085
	25 14 1	0,0374	-0,01
miR-181a	27 20 1	-0,0159	0,0042
miR-182	11 1 2	-0,0998	0,0266
	11 2 2	-0,0231	0,0062
miR-194	31 12 3	-0,045	0,012
miR-196a	8 1 1	-0,0441	0,0118
	15 11 3	0,0019	0,0005
miR-200c	1 13 3	-0,056	0,0149
	1 14 3	-0,0105	0,0028
miR-218-2	14 13 1	0,1066	-0,0284
	<b>14 14 1*</b>	0,1608	-0,0429
miR-220	30 16 1	0,0332	-0,0089
miR-329	8 10 3	0,0205	-0,0055
miR-338	9 16 3	0,0258	-0,0069
miR-369	1 18 3	0,0189	-0,005
miR-409-3p	16 19 3	0,0707	-0,0189
miR-410	8 19 3	0,002	-0,0004
miR-448	8 4 4	0,0189	-0,0051
miR-490	<b>31 9 7*</b>	0,5226	-0,1394
	<b>31 10 7*</b>	0,503	-0,1341
miR-494	10 11 3	0,0721	-0,0192
	10 12 3	0,1122	-0,0299
miR-499	28 11 3	0,0311	-0,0083
	28 12 3	0,0191	-0,0051
miR-520h	<b>31 15 4*</b>	0,5578	-0,1488
	<b>31 16 4*</b>	0,5235	-0,1396
let-7i	29 9 3	-0,0252	0,0067
	29 10 3	-0,0195	0,0052

Fig. 13B

Tabla 5: Genes diana que se correlacionan de forma negativa con <i>miR-181a</i> en tumores de próstata				
Gen	N.º ID del GenBank	N.º ID de Affy	Coefficiente de correlación de Pearson (intervalo de confianza del 95 %)	Valor P
<i>NAB1</i>	AF045451	209272_at	-0,57 (-0,38 a -0,72)	1,5E-06
<i>DUSP6</i>	BC003143	208892_s_at	-0,55 (-0,35 a -0,71)	4,2E-06
		208893_s_at	-0,51 (-0,29 a -0,67)	3,6E-05
<i>SCHIP1</i>	NM_014575	204030_s_at	-0,52 (-0,31 a -0,68)	2,1E-05
<i>PLCL2</i>	AL117515	213309_at	-0,48 (-0,26 a -0,66)	8,8E-05
<i>SLC9A6</i>	NM_006359	203909_at	-0,48 (-0,26 a -0,66)	9,0E-05
<i>RAP1B</i>	NM_015646	200833_s_at	-0,44 (-0,20 a -0,62)	0,0005
<i>BAB3</i>	NM_001704	205638_at	-0,43 (-0,20 a -0,62)	0,0005
<i>RIN2</i>	AL136924	209684_at	-0,42 (-0,19 a -0,61)	0,0008
<i>CUL3</i>	AU145232	201372_s_at	-0,42 (-0,18 a -0,61)	0,0009
<i>FBX011</i>	NM_018693	203255_at	-0,42 (-0,18 a -0,61)	0,0009
<i>HMGB2</i>	BC000903	208808_s_at	-0,40 (-0,16 a -0,59)	0,002
<i>KLHL2</i>	NM_07246	219157_at	-0,37 (-0,13 a -0,57)	0,003
<i>ADAMTS5</i>	NM_007038	219935_at	-0,36 (-0,12 a -0,57)	0,004
<i>ATP1B1</i>	NM_001677	201243_s_at	-0,36 (-0,12 a -0,56)	0,005
<i>CHD9</i>	BF668950	212616_at	-0,36 (-0,12 a -0,56)	0,005
<i>C5orf5</i>	NM_016603	218518_at	-0,36 (-0,11 a -0,56)	0,005
<i>GPM6A</i>	BF939489	209469_at	-0,35 (-0,10 a -0,55)	0,006
<i>NMT2</i>	NM_004808	205006_s_at	-0,34 (-0,09 a -0,54)	0,009
<i>OSBPL8</i>	BF970829	212585_at	-0,33 (-0,08 a -0,54)	0,01
<i>FLT1</i>	AA058828	222033_s_at	-0,31 (-0,07 a -0,53)	0,01
<i>DEK</i>	NM_003472	200934_at	-0,31 (-0,06 a -0,52)	0,02
<i>MAT2A</i>	AW301861	213705_at	-0,31 (-0,06 a -0,52)	0,02
<i>PLAG1</i>	NM_002655	205372_at	-0,30 (-0,05 a -0,51)	0,02
<i>HEXIM1</i>	NM_006460	202815_s_at	-0,30 (-0,05 a -0,51)	0,02
<i>SCML2</i>	NM_006089	206147_x_at	-0,30 (-0,05 a -0,51)	0,02
<i>B4GALT1</i>	D29805	201883_s_at	-0,28 (-0,04 a -0,50)	0,03
<i>BCL2</i>	NM_000633	203605_at	-0,29 (-0,03 a -0,50)	0,03
<i>TRIM2</i>	NM_015271	202342_s_at	-0,28 (-0,03 a -0,50)	0,03
<i>UBE2B</i>	AI768723	202334_s_at	-0,28 (-0,03 a -0,50)	0,03
<i>TNFRSF11B</i>	BF433902	204932_at	-0,28 (-0,02 a -0,50)	0,03
<i>SSX2IP</i>	AL133046	210871_x_at	-0,27 (-0,01 a -0,49)	0,04
		203019_x_at	-0,26 (-0,01 a -0,48)	0,05
<i>AX</i>	NM_014729	204530_s_at	-0,26 (-0,01 a -0,48)	0,04
<i>GHITM</i>	AL136713	209248_at	-0,26 (-0,01 a -0,48)	0,04

Fig. 14



<b>Tabla 6: microARN sensibles a andrógenos</b>		
<b>Nombre del gen</b>	<b>Expresión</b>	<b>Emplazamiento cromosómico</b>
<i>miR-338</i>	3,1	17q25.3
<i>miR-126-5p</i>	0,45	9q34.3
<i>miR-146b</i>	0,71	10q2432
<i>Grupo de miR-181b-1</i>	0,53	1q31.3
<i>Grupo de miR-181c</i>	0,5	19p13.12
<i>miR-219-5p</i>	0,43	6p21.32
<i>Grupo de miR-221</i>	0,56	Xp11.3
<b>Células tratadas con R1881 10 nM frente a  tratadas de forma simulada (referencia);  FDR &lt; 5 %</b>		

Fig. 15

<b>Tabla 7: Supuestos sitios de unión al receptor de andrógenos en la secuencia flanqueante de los microARN</b>									
<b>Nombre del gen</b>	<b>Sitio de unión</b>	<b>Posición de inicio</b>	<b>Posición final</b>	<b>Región flanqueante</b>	<b>Longitud del microARN</b>	<b>Puntuación de probabilidad</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Cadena</b>	<b>SEQ ID No.</b>
<i>miR-126</i>	ARE.02	2533	2551	3'UTR	85	0,917	caAGAGCTcttTG TCCTgg	-	<b>1</b>
<i>miR-146b</i>	ARE.02	75	93	5'UTR	73	0,911	agCCCACcttcTG TCCTcg	-	<b>2</b>
<i>miR-146b</i>	PRE.01	2168	2186	3'UTR	73	0,843	agACGGAGctcTG TTCTgt	+	<b>3</b>
<i>miR-181b-1</i>	PRE.01	814	832	5'UTR	110	0,843	ctAAATAAagatTG TTCTta	+	<b>4</b>
<i>miR-181b-1</i>	PRE.01	1046	1064	5'UTR	110	0,851	caGGGACAatTG TTATtc	-	<b>5</b>
<i>miR-181b-1</i>	PRE.01	1953	1971	3'UTR	110	0,892	ttACAAATatgTG TTCTtt	+	<b>6</b>
<i>miR-181b-1</i>	GRE.01	1976	1994	3'UTR	110	0,862	ctTTTGTTagaTGT TCTgg	+	<b>7</b>
<i>tniR-181b-1</i>	GRE.01	2129	2147	3'UTR	110	0,878	acTGTCATgagTG TTCTga	-	<b>8</b>
<i>miR-181c</i>	GRE.01	2755	2773	3'UTR	110	0,861	caGGTCTTcagTG TCCTcc	-	<b>9</b>
<i>miR-181c</i>	ARE.01	2933	2951	3'UTR	110	0,803	gtGGTGCTttTGT TGTtg	+	<b>10</b>
<i>miR-219-1</i>	ARE.02	381	399	5'UTR	110	0,914	tgGGAACtagAG TCCTca	-	<b>11</b>
<i>miR-219-1</i>	ARE.02	1196	1214	5'UTR	110	0,905	gaTGGGCAtctTG TCCCcg	-	<b>12</b>
<i>miR-219-1</i>	PRE.01	1695	1713	3'UTR	110	0,84	ggACCTAGgtgTG TTCTca	+	<b>13</b>
<i>miR-221</i>	ARE.02	1710	1728	3'UTR	1.10	0,891	agCTTTCtgcGG TCCtTt	-	<b>14</b>
<i>miR-221</i>	GRE.01	1998	2016	3'UTR	110	0,85	caGTTTATttTGT TCTcc	+	<b>15</b>
<i>miR-221</i>	PRE.01	2551	2569	3'UTR	110	0,875	aaAGATTGtacTG TTCTct	+	<b>16</b>
<i>miR-221</i>	PRE.01	2937	2955	3'UTR	110	0,84	ctTACTTctgaTGT TCTtt	+	<b>17</b>
<i>miR-338</i>	GRE.01.	1456	1474	5'UTR	67	0,859	acGGGGCCacgTG TCCtTc	-	<b>18</b>
<i>tniR-338</i>	GRE.01	1653	1671	3'UTR	67	0,879	acAGGGCCatgTG TCCTgg	-	<b>19</b>

Nota: la búsqueda de supuestos sitios de unión al receptor en la región flanqueante (1,5 kb cadena arriba y 1,5 kb cadena abajo) de cada locus de microARN utilizando la base de datos de Genomatix. El sitio de inicio para el recuento (3 kb + longitud del precursor de microARN) es el extremo 5' de la región flanqueante de 1,5 kb 5'. Matrices de Genomatix para los sitios de unión al receptor de andrógenos: ARE.01: RGNACRnngTGTCT [SEQ ID NO:20]; ARE.02: DNWCWtnnTGTYCT [SEQ ID NO:21]; PRE.01: RGNACNknTGTCT [SEQ ID NO:22]; GRE.01: GGTWCWnnnTGTCT [SEQ ID NO:23]; GRE.02: RGAACAsnnTGTCT [SEQ ID NO:24].

**Fig. 16**

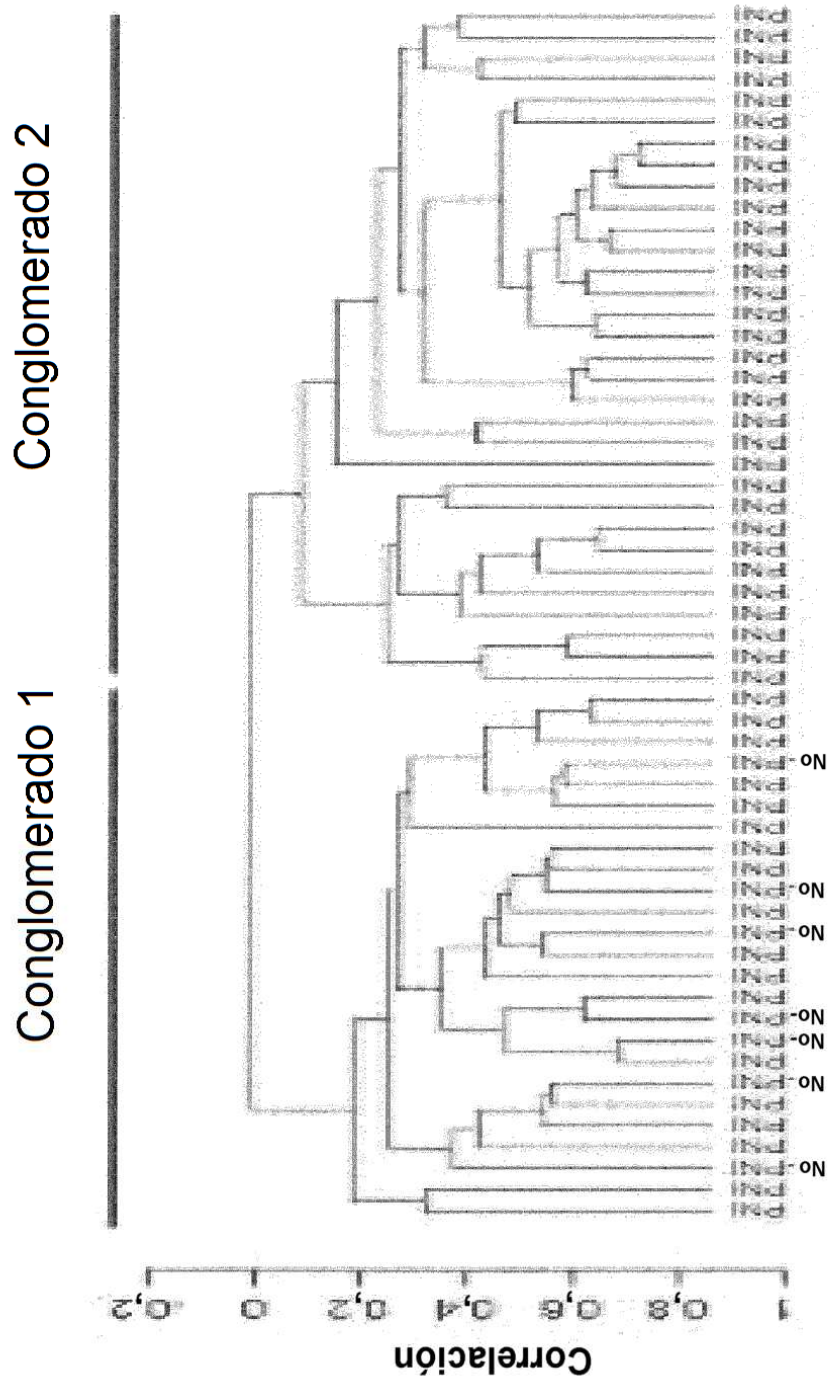


Fig. 17A

	Conglomerado 1	Conglomerado 2	Total
PNI	18	32	50
No PNI	7	0	7
Total	25	32	57

Fig. 17B

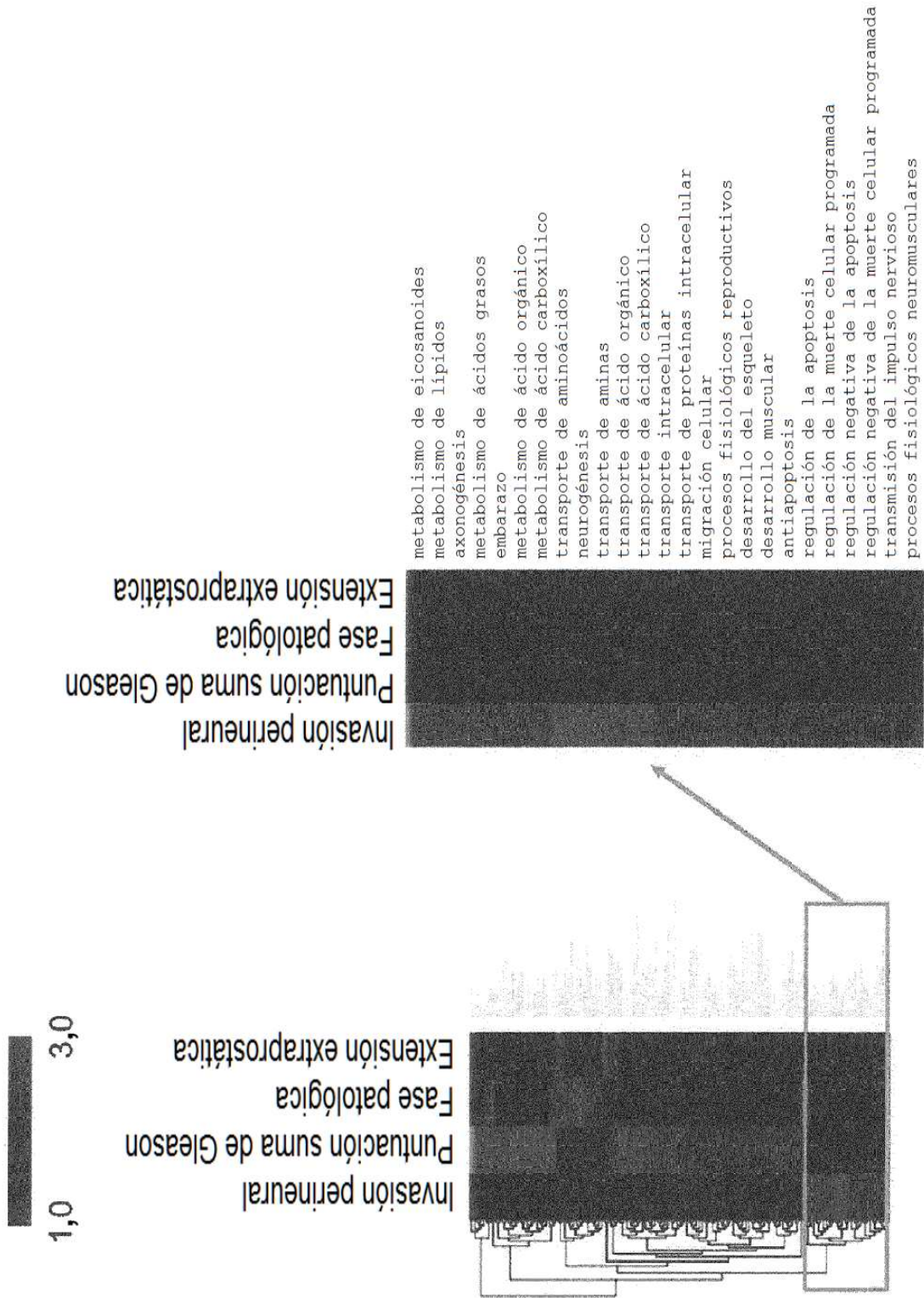
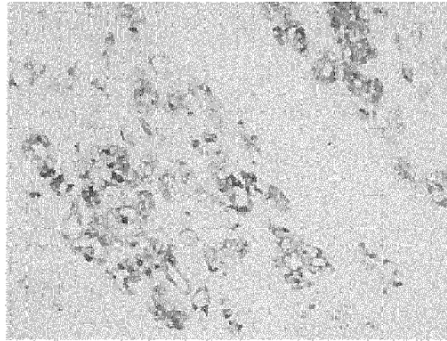
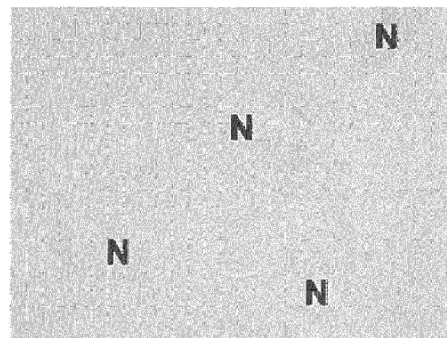


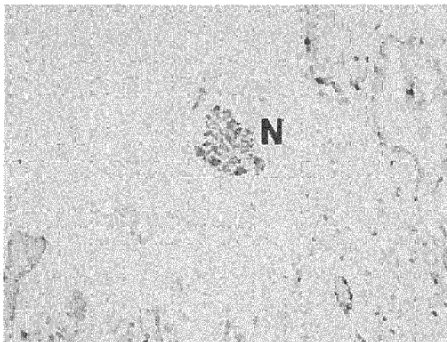
Fig. 18



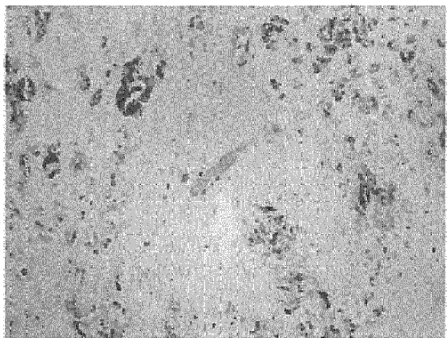
**Fig. 19A**



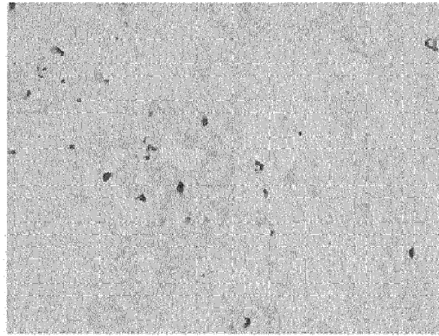
**Fig. 19B**



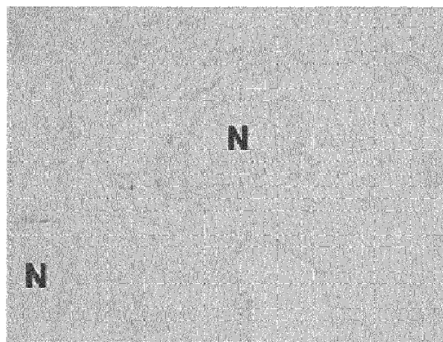
**Fig. 19C**



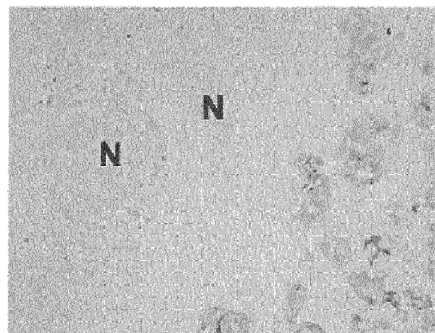
**Fig. 19D**



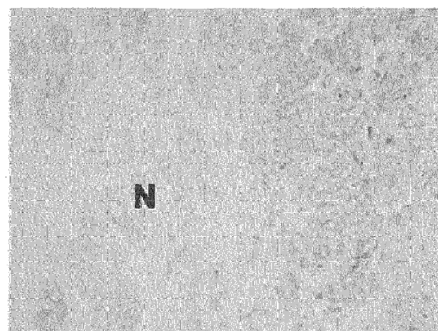
**Fig. 20A**



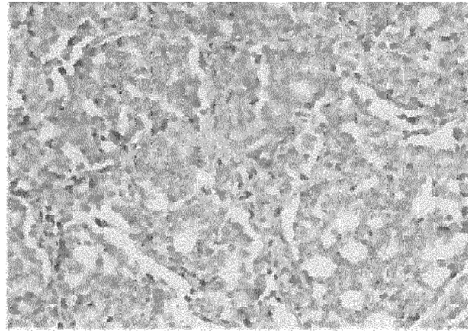
**Fig. 20B**



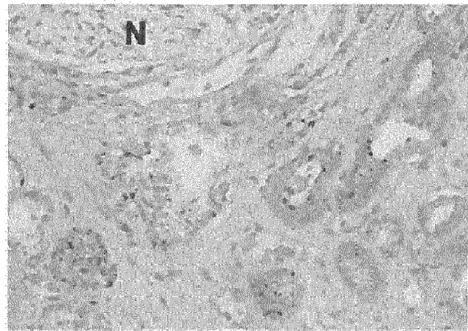
**Fig. 20C**



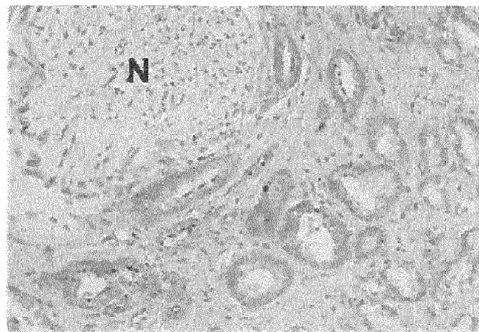
**Fig. 20D**



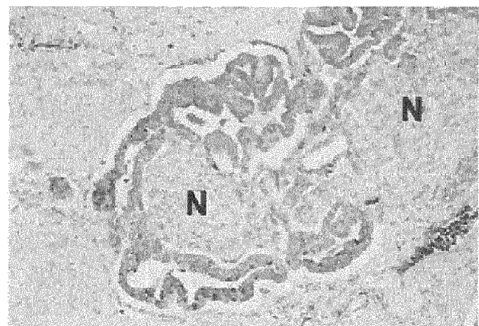
**Fig. 21A**



**Fig. 21B**



**Fig. 21C**



**Fig. 21D**

TABLA 8 - Características clínicas de la población de estudio				
	Todos los casos (n = 60)	Invasión perineural (n = 50)	Sin invasión perineural (n = 7)	Valor <i>P</i> <sup>2</sup>
Edad en el momento de la prostatectomía [mediana (intervalo)] n = 57	61 (46 - 73)	60 (48 - 77)	62 (60 - 68)	0,22 <sup>b</sup>
PSA en el momento del diagnóstico [mediana (intervalo)] n = 48 <sup>a</sup>	5,9 (1,3 - 47,7)	6,1 (3,8 - 47,7)	5,4 (1,3 - 8,8)	0,19 <sup>b</sup>
Nódulo individual más grande (gramos) [mediana (intervalo)] n = 56 <sup>a</sup>	1,5 (0,2-3,0)	1,6 (0,8 - 3,0)	1,0 (0,2 - 2,0)	0,006 <sup>b</sup>
Puntuación suma de Gleason < 7(5-6) ≥ 7 (7-9)	13 (23) 44 (77)	9 (18) 41 (82)	4 (57) 3 (43)	0,04 <sup>c</sup>
Extensión extraprostática No Sí	33 (58) 24 (42)	26 (52) 24 (48)	7 (100) 0 (0)	0,02 <sup>c</sup>
Invasión de la vesícula seminal No Sí	47 (82) 10 (18)	40 (80) 10 (20)	7 (100) 0 (0)	0,33 <sup>c</sup>
<sup>a</sup> No estaba disponible la información sobre algunos casos. <sup>b</sup> Prueba t de dos colas. <sup>c</sup> Prueba exacta de Fisher de dos colas				

Fig. 22

TABLA 9 – microARN regulados de forma positiva en tumores con PNI (FDR ≤ 10 %)		
microARN	Cambio veces	Emplazamiento cromosómico
<i>miR-224</i>	2,68	Xq28
<i>miR-21</i>	2,65	17q23.2
<i>nuR-10 (a/b)</i>	2,63	17q21.32/2q31.1
<i>miR-125b (-1/2)</i>	2,42	11q24.1/21q21.1
<i>miR-30a/b/c-2/d</i>	2,33	6q13/8q24.22
<i>miR-100</i>	2,24	11q24.1
<i>miR-24 (-1/2)</i>	2,12	9q22.32/19p13.12
<i>miR-15a-2</i>	2,06	13q14.2
<i>miR-191</i>	2,04	5p21.31
<i>miR-99b</i>	2,03	19q13.41
<i>miR-27a/b</i>	2,00	19p13.12/9q22.32
<i>miR-26a (-1/2)</i>	1,87	3p22.3/12q14.1
<i>miR-126</i>	1,68	9q34.3
<i>miR-145</i>	1,84	5q32
<i>miR-195</i>	1,67	17p13.1
<i>miR-181a-l</i>	1,64	1p31.1
<i>miR-199b</i>	1,58	9q34.11
<i>miR-151</i>	1,55	8q24.3
<i>let-7g</i>	1,47	3p21.2
Cambio en veces: Expresión en PNI frente a no PNI (referencia)		

Fig. 23



TABLA 10 - ARN que codifican proteínas con expresión diferencial entre tumores PNI y no PNI					
Gen	Nombre del gen	ID del GenBank	Cambio en veces*	FDR (%)	Puntuación de Gleason**
<i>MTIM</i>	Metalotioneína 1M	M06655	0,30	0	0,52 (0)
<i>PTPRM</i>	Proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor M	NM_002845	0,37	0	ND
<i>PTGER4</i>	Receptor de la prostaglandina E 4 (subtipo EP4)	AA897516	0,46	0	ND
<i>C9orf46</i>	Marco de lectura abierta 46 del cromosoma 9	NM_018465	0,47	0	0,74 (6)
<i>MAN2B2</i>	Manosidasa, alfa, clase 2B, miembro 2	AW954107	0,68	0	ND
<i>SLC38A4</i>	Familia del transportador de soluto 38, miembro 4	NM_018018	0,19	5	ND
<i>NPR3</i>	Receptor del péptido atrionatriurético C	AI628360	0,29	5	ND
<i>ODZI</i>	Homólogo de odd Oz/ten-m 1	AL022718	0,35	5	ND
<i>MT1F</i>	Metalotioneína 1F	M10943	0,52	5	0,66 (0)
<i>ABAT</i>	4-amimobutirato aminotransferasa	AF237813	0,52	5	0,79 (18)
<i>INPP4B</i>	Inositol polifosfato-4-fosfatasa, tipo II	NM_003866	0,53	5	ND
<i>FECH</i>	Ferroquelatasa	NM_000140	0,56	5	ND
<i>TNFAIP8</i>	Factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 8	NM_014350	0,58	5	ND
<i>TTC12</i>	Dominio repetido de tetratricopéptido 12	NM_017868	0,58	5	ND
<i>MT1H</i>	Metalotioneína 1H	NM_005951	0,59	5	0,64 (0)
<i>MT2A</i>	Metalotioneína 2A	NM_005953	0,64	5	0,68 (0)
<i>AP2S1</i>	Complejo de proteínas relacionadas con el adaptador 2, subunidad S1	NM_004069	0,66	5	ND
<i>RAB27A</i>	RAB27A, miembro de la familia de genes RAS	AF125393	0,50	7	0,66 (3)
<i>SMS</i>	Espermina sintasa	NM_004595	0,56	7	ND
<i>IACTB2</i>	Lactamasa, beta 2	NM_016027	0,59	7	ND
<i>EIF5B</i>	Factor de iniciación de la traducción eucariota 5B	NM_015904	0,81	7	ND
<i>GPR37</i>	Receptor acoplado a proteína G 37	U87460	0,29	9	ND
<i>MAF</i>	Homólogo del oncogén v-maf	NM_005360	0,43	9	0,69 (2)
<i>ACADL</i>	Acil-coenzima A deshidrogenasa, cadena larga	NM_001608	0,46	9	0,75 (7)
<i>MAGEH1</i>	Familia del antígeno del melanoma H, 1	NM_014061	0,55	9	0,72 (2)
<i>TBC1D4</i>	Familia del dominio TBC1, miembro 4	NM_014832	0,55	9	ND
<i>MTIG</i>	Metalotioneína 1G	NM_005950	0,57	9	0,61 (0)
<i>ZNF652</i>	Proteína de dedos de cinc 652	NM_014897	0,59	9	ND
<i>MTIX</i>	Metalotioneína 1X	NM_005952	0,64	9	0,67 (0)
<i>APXL</i>	Similar a proteína apical ( <i>Xenopus laevis</i> )	NM_001649	0,64	9	0,82 (12)
<i>CXADR</i>	Receptor del virus coxsackie y de adenovirus	NM_001338	0,68	9	ND
<i>MRPL39</i>	Proteína ribosómica mitocondrial L39	NM_017446	0,72	9	ND
<i>MGST3</i>	Glutación S-transferasa microsomal 3	NM_004528	0,73	9	0,75 (0)
<i>MRPS11</i>	Proteína ribosómica mitocondrial S1	AB049944	0,80	9	ND

\* Cambio en veces: Expresión en PNI frente a no PNI (referencia); \*\* Puntuación de Gleason: Cambio en veces (FDR %) para puntuación de Gleason elevada (7-9) frente a baja (5-6) (referencia); ND: No hay diferencia (FDR < 30 %)

Fig. 24

Tabla 11: Validación de los resultados de micromatriz mediante qRT-PCR para genes seleccionados		
Gen	qRT-PCR	Matriz
	Cambio en veces <sup>a</sup>	Cambio en veces
<i>Metalotioneína-1M</i>	0,26	0,30
<i>Metalotioneína-1F</i>	0,31	0,52
<i>microARN</i>	qRT-PCR	Matriz
	Cambio en veces <sup>b</sup>	Cambio en veces
<i>miR-224</i>	5,72	2,68
<i>miR-10b</i>	2,84	2,63
<i>miR-125b</i>	4,29	2,42
<i>miR-30c</i>	2,15	2,44
<i>miR-100</i>	2,08	2,24

<sup>a</sup> Cambio en veces: Expresión en PNI (n = 36) frente a no PNI (referencia; n = 7); <sup>b</sup> Cambio en veces: Expresión en PNI (n = 23) frente a no PNI (referencia; n = 7); Todas las diferencias del cambio en veces fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ; prueba Mann Whitney U de dos colas).

Fig. 25

TABLA 12: Procesos biológicos más enriquecidos de forma significativa para genes expresados de forma diferencial comparando tumores PNI con tumores no PNI					
Término GOBP	Listado de PNI	Listado de PNI	Población	Población	Prueba exacta de Fisher
	Aciertos del término <sup>a</sup>	Total <sup>b</sup>	Aciertos del término <sup>c</sup>	Total <sup>d</sup>	Valor P
Metabolismo del ácido orgánico (carboxílico)	9	62	453	16762	4,0E-05
Transporte de aminoácidos	4	62	68	16762	1,2E-04
Transporte de aminas	4	62	73	16762	1,5E-04
Transporte de ácido orgánico (carboxílico)	4	62	83	16762	2,5E-04
Metabolismo de L-fenilalanina	2	62	10	16762	5,9E-04
Catabolismo de la familia de aminoácidos aromáticos	2	62	12	16762	8,7E-04
Metabolismo de compuestos aromáticos	2	62	14	16762	1,2E-03
Metabolismo de ácidos grasos	4	62	140	16762	1,8E-03
Neurogénesis	5	62	259	16762	2,7E-03
Metabolismo de la familia de aminoácidos aromáticos	2	62	29	16762	5,1E-03
Metabolismo de aminoácidos y derivados	5	62	309	16762	5,7E-03

<sup>a</sup> Número de genes anotados en un término GOBP que se expresan de forma diferencial cuando se comparan tumores con PNI frente a tumores sin PNI; <sup>b</sup> Todos los genes anotados en GOBP que se expresan de forma diferencial en esta comparación; <sup>c</sup> Todos anotados; genes en un término GOBP; <sup>d</sup> Todos genes anotados en GOBP.

Fig. 26