

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/150167 A2

(43) Fecha de publicación internacional
10 de octubre de 2013 (10.10.2013) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/070218
- (22) Fecha de presentación internacional:
3 de abril de 2013 (03.04.2013)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201230513 3 de abril de 2012 (03.04.2012) ES
- (71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. De La Constitución, 18, Sevilla, E-41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias, s/n, Sevilla, E-41013 Sevilla (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; Avda de María Luisa, s/n, Palacio Pabellón de Perú, Sevilla, E-41013 Sevilla (ES).
- (72) Inventores; e
- (71) Solicitantes (para US solamente): **GARCÍA CARBONERO, Rocio** [ES/ES]; Fundación Pública Andaluza Progreso Y Salud, Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º, Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93 Sevilla E-41092 Sevilla (ES). **PAZ-ARES, Luis Gonzalo** [ES/ES]; Fundación Pública Andaluza Progreso Y Salud, Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º, Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93 Sevilla E-41092 Sevilla (ES). **MOLINA PINELO, Sonia** [ES/ES]; Fundación Pública Andaluza Progreso Y Salud, Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º, Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93 Sevilla E-41092 Sevilla (ES). **CARNERO MOYA, Amancio** [ES/ES]; Fundación Pública Andaluza Progreso Y Salud, Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º, Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93 Sevilla E-
- 41092 Sevilla (ES). **SUAREZ BELTRAN, Rocio** [ES/ES]; Fundación Pública Andaluza Progreso Y Salud, Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º, Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93 Sevilla E-41092 Sevilla (ES).
- (74) Mandatario: **FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo**; C/ Paseo de la Habana 9-11, Madrid, E-28036 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
 - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: MICRORNA EXPRESSION MODEL AS A SURVIVAL INDICATOR IN PATIENTS HAVING METASTATIC COLORECTAL CANCER

(54) Título : MODELO DE EXPRESIÓN DE MICROARN COMO INDICADOR DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES DE CANCER COLORRECTAL METASTÁSICO

(57) Abstract: Colorectal cancer is among the most common causes of cancer-related death in the Western world and one of the most common malignant tumours in the world. Treatment for metastatic colorectal cancer normally includes chemotherapy, although success rates vary considerably among patients. It is therefore necessary to predict responses and survival rates in individual patients. The present invention provides methods and tools that represent greater progress. In particular, the invention provides information on a set of microRNAs which can be used in methods for predicting the survival of patients treated with chemotherapy. The invention also relates to the tools which can be used in said prediction methods.

(57) Resumen: El cáncer colorrectal está entre las causas más comunes de muerte relacionada con cáncer en el mundo occidental y entre los tumores malignos más comunes en el mundo. El tratamiento del cáncer colorrectal metastásico comprende normalmente quimioterapia, aunque el éxito de la terapia varía significativamente entre los pacientes. Existe de esta manera una necesidad de predecir la respuesta y las índices de supervivencia de los pacientes individuales. La presente invención proporciona procedimientos y herramientas que representan un avance mayor. En particular, la invención informa acerca de un conjunto de microARN que son útiles en los procedimientos de predecir la supervivencia de pacientes tratados con quimioterapia. Las herramientas aplicables en dichos procedimientos de predicción son también parte de la invención.

WO 2013/150167 A2

**MODELO DE EXPRESIÓN DE MICROARN COMO INDICADOR DE
SUPERVIVENCIA EN PACIENTES DE CÁNCER COLORRECTAL
METASTÁSICO**

Antecedentes de la invención

5 El cáncer colorrectal (CRC), comúnmente conocido como cáncer de intestino, es un cáncer que procede del crecimiento celular descontrolado en el colon, recto o apéndice, y se origina a partir de las células epiteliales que tapizan el colon o el recto del tracto gastrointestinal. Los síntomas y signos del cáncer colorrectal dependen de la localización del tumor en el intestino. El CRC
10 es la segunda causa más común de muerte relacionada con cáncer en el mundo occidental (Knijin y col., Discov. Med. 2010 (47):328-36). Es también el tumor maligno más común en el mundo (Jemal y col., 2011, CA Cancer J. Clin. 61(2): 69-90). Se estima que se podrían evitar por lo menos un 60% de muertes por cáncer colorrectal si toda la población de varones y mujeres de 50
15 años o más se controlara de manera rutinaria, aunque los procedimientos de cribado son a menudo insatisfactorios. Cuando se detecta en etapas iniciales, las posibilidades de cura gracias a una resección del tumor aumentan mucho. Sin embargo, la incidencia y mortalidad del CRC están creciendo debido a la elevada tasa de incidencia del tumor. A pesar de los avances en la detección
20 temprana del CRC, aproximadamente un 40% de pacientes muere debido a la progresión del tumor después de 5 años de seguimiento (Parkin, 2004, Mol. Cancer Ther. 9(12): 3396-3409).

Una de las razones relacionadas con la baja tasa de supervivencia de los pacientes de CRC es que casi el 50% de pacientes de cáncer colorrectal
25 desarrollan metástasis, lo que conduce al cáncer colorrectal metastásico (MCRC). La tendencia al desarrollo de metástasis es también lo que hace al CRC particularmente peligroso (Knijin y col., Discov. Med. 2010 (47):328-36). El cáncer colorrectal metastásico es por tanto un cáncer que experimenta una diseminación desde el lugar en el que se inició por primera vez a otro
30 lugar/órgano del cuerpo. El cáncer colorrectal avanzado (CRC avanzado o ACC) se puede definir como el cáncer colorrectal que en la presentación (o

recaída) es tanto (i) metastásico como (ii) tan avanzado localmente que no se puede llevar a cabo la resección quirúrgica con intenciones curativas. El cáncer colorrectal metastásico (MCRC) se incluye de esta manera en el CRC avanzado.

5 De manera breve, el cáncer colorrectal se puede dividir en varias etapas, dependiendo de las medidas de la diseminación del tumor primario a través de las capas de la pared del colon o recto hacia los órganos adyacentes, nódulos linfáticos y sitios distantes, evaluando por consiguiente la progresión del tumor. Originalmente existía el sistema de clasificación de Dukes, que clasificaba los
10 pacientes en una de tres categorías (Etapas A, B, C). Astler-Coller modificó posteriormente este sistema para incluir una cuarta etapa (etapa D) (Astler y col., Ann. Surg. 1954; 139:846-852); Gunderson y Sosin transformaron con posterioridad éste de nuevo en 1978. Más recientemente, el American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha introducido el sistema de estadificación TNM,
15 que sitúa a los pacientes en una de cuatro etapas (Etapa I–IV), tal como desarrolló el American Joint Committee on Cancer (AJCC Cancer Staging Manual, 7ª ed., Springer, Nueva York, NY, 2002). La estadificación de los tumores rectales se lleva a cabo con unos criterios similares a los utilizados para los tumores de colon. Los cánceres de colon se clasifican en localizados
20 (etapa I y etapa II), diseminados regionalmente (etapa III) o diseminados a distancia (etapa IV).

La elección del tratamiento para un paciente concreto se basará en consideraciones que implican la etapa del cáncer. Las opciones clásicas implican cirugía y/o terapia mediante la administración de fármaco(s)
25 anticanceroso(s). Para eliminar tumores en el colon debidos a cáncer de colon, la resección es el tratamiento más común. Tras la cirugía, se van a necesitar chequeos regulares para asegurar que el cáncer no se ha reproducido.

Se sabe que, en el caso del CRC, la (quimio)terapia auxiliar es eficaz en la prevención de la extensión de la enfermedad metastásica que procede de un
30 cáncer colorrectal que se ha eliminado quirúrgicamente. De esta manera, la (quimio)terapia auxiliar es normalmente un tratamiento de seguimiento para

individuos que se han sometido a cirugía. Los fármacos citotóxicos actualmente usados en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado (ACC) son principalmente las fluoropirimidinas (tales como 5-fluorouracilo), irinotecán y oxaliplatino (Knijin y col., *Discov. Med.* 2010 (47):328-36). Durante mucho tiempo, 5-fluorouracilo más leucovorina (5-FU/LV) fue la única pauta terapéutica eficaz con un tiempo promedio de supervivencia total (OS) de aproximadamente 12 meses. Otros dos agentes citotóxicos, irinotecán y oxaliplatino, han mejorado adicionalmente el OS promedio (Koopman y Punt, 2009, *Eur. J. Cancer*, 45 Suppl 1:50-6). Recientemente, el tratamiento con anticuerpos monoclonales, la así denominada "terapia dirigida", ha añadido algún beneficio adicional a las terapias CRC existentes (Knijin y col., *Discov. Med.* 2010 (47):328-36). Sin embargo, se sabe generalmente que la "terapia dirigida" mediada por anticuerpos es cara y que, en muchos casos, su éxito puede depender de algunos modelos de expresión génica en la célula diana tipo. Por tanto, sería también deseable pronosticar qué pacientes responden bien a un tratamiento quimioterapéutico clásico.

En general, se ha informado que algunos factores biológicos están implicados en diversos tipos particulares de cánceres, incluyendo las mutaciones somáticas de genes concretos, la expresión alterada de proteínas, y la activación alterada de proteínas, y modelos alterados de expresión génica. Sin embargo, lo que llega a ser evidente de dichos estudios es que se encuentran implicados diferentes factores en diferentes tipos de cánceres, y que las relaciones cruzadas son difíciles y poco fiables.

El valor clínico de los marcadores moleculares en términos de su significancia como marcadores pronósticos o predictivos en el cáncer colorrectal metastásico (MCRC) sigue siendo poco claro. Hasta la fecha, se han descrito cambios somáticos con una respuesta a la terapia en el CRC, tales como KRAS, BRAF, poliposis adenomatosa del colon (APC) y mutaciones de TP53. Muchas de estas proteínas implicadas en las rutas claves de señalización del CRC están alteradas y parecen verse afectadas por la regulación del miARN. Tal y como se detalla a continuación, los microARN

(miARN) son moléculas cortas de ARN no codificante que funcionan como reguladores postraduccionales de la expresión génica. De esta manera, mediante dos tipos de enfoque en el CRC, es decir, el perfilado y el análisis funcional del miARN, ha sido posible mejorar nuestro conocimiento acerca de algunos marcadores moleculares asociados con el CRC. Algunos estudios han examinado los perfiles de expresión del miARN en tumores colorrectales y tejidos no tumorales para evaluar su asociación con el CRC (etapas). Por ejemplo, en el caso del documento US2009/0233297A1, los inventores debían identificar los miARNs que son útiles para el diagnóstico y/o el pronóstico de la recurrencia colorrectal en pacientes con cáncer en la etapa II o la etapa III. Desde un punto de vista funcional, se ha relacionado la expresión de algunos miARNs con un papel en las rutas de la patogénesis del CRC, tales como las alteraciones en la familia miR-135 que regula los niveles de APC, que conducen a la activación de la ruta de la Wnt/ β -catenina (Nagel y col., 2008., Cancer Res 68(14): 5795-5802). Se ha sugerido también que la ruta de señalización de EGFR contribuye al desarrollo y a la progresión del CRC (Krasinskas, A. M. (2011), Patholog. Res. Int. 2011: 932932), y se ha descrito KRAS como una diana directa de la familia del miARN de let-7, miR-143, miR-146b-3p, miR-18a, y miR-486-5p (Johnson y col. 2005, Cell 120(5): 635-647). Algunos estudios, tales como el de Slaby y col., Mol. Cancer, 2009, 8:102 han intentado ampliar la imagen mediante cartografiado de factores individuales, tales como miARNs individuales en el CRC, en rutas conocidas de señalización celular. Dichos intentos llegan, sin embargo, con el inconveniente de que cualquier miARN dado tiene una gran variedad de dianas diferentes (en algunas estimaciones aproximadamente 200 dianas por miARN de promedio), y por lo tanto dicho miARN dado está implicado normalmente en una multiplicidad de rutas celulares diferentes. A pesar del esfuerzo de Slaby y col., no es posible actualmente asignar de manera general un tipo de cáncer concreto a un conjunto de miARNs específicos, y a su vez, no es posible generalmente cartografiar un miARN concreto en una ruta conocida. Aún es menos posible predecir qué miARN podría estar asociado con alguna

respuesta determinada a algún tratamiento concreto. Las actuales estimaciones del riesgo de recurrencia, decisiones de tratamiento y respuesta al tratamiento se siguen basando principalmente en la etapa del tumor. En el caso del cáncer de colon por ejemplo, la existencia de metástasis nodal ha sido el factor global de pronóstico más utilizado en la determinación de la supervivencia a largo plazo de los pacientes que padecen cáncer de colon. El resultado clínico, sin embargo, depende en gran medida de la comprensión de la biología del tumor. Sería, por tanto, de ayuda identificar biomarcadores fiables en pacientes que padecen CRC, lo que permitiría la predicción de la respuesta de pacientes a la quimioterapia y también ayudaría a la elección de una terapia apropiada para estos individuos y de esta manera, en último extremo, a la prolongación de la vida o a la mejora de la calidad de vida. No existen hasta el momento estudios comprensivos que relacionen un perfil de expresión de miARNs con la respuesta a la quimioterapia en pacientes que padecen CRC metastásico.

Problema a resolver

Debido a que el CRC avanzado es una forma particularmente peligrosa de CRC, resulta muy deseable predecir qué pacientes con CRC avanzado responden bien al tratamiento quimioterapéutico. Una meta de la presente invención es, por tanto, la provisión de un procedimiento fácil y fiable *in vitro* capaz de predecir la respuesta a la quimioterapia de aquellos pacientes que padezcan de cáncer colorrectal avanzado.

De esta manera, un primer objetivo de la presente invención es el de superar algunos inconvenientes asociados con los procedimientos predictivos del CRC presentes en el estado de la técnica. En este sentido, la presente invención proporciona una serie de procedimientos y herramientas útiles para predecir la supervivencia de aquellos pacientes que padezcan de cáncer colorrectal, en particular la presente invención predice la supervivencia global o la supervivencia exenta de progresión. Un objetivo adicional de la presente invención, radica en proporcionar la medicación apropiada para un paciente individual que padezca de CRC basándose en la predicción del éxito del

tratamiento. Un problema adicional a resolver es la provisión de un sistema de detección, tal como un kit, que puede ser útil en los procedimientos de la invención.

Términos y abreviaturas

5	ACC	cáncer colorrectal avanzado
	CR	respuesta completa
	CRC	cáncer colorrectal
	Ct	valor umbral de ciclo
	ADN	ácido desoxirribonucleico
10	MCRC	cáncer colorrectal metastásico
	ARNm	ARN mensajero
	miARN	microARN
	RECIST	Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos
	ARN	ácido ribonucleico
15	OS	supervivencia global
	PD	enfermedad progresiva
	PFS	supervivencia exenta de progresión
	PR	respuesta parcial
	SEQ	secuencia
20	SD	enfermedad estable
	TNM	Sistema de estadificación tumor-nódulo-metástasis

Breve descripción de la invención

La presente invención, proporciona un procedimiento de predicción de la respuesta de un sujeto humano, en el que el sujeto padece cáncer colorrectal preferiblemente cáncer colorrectal metastásico, a quimioterapia. El procedimiento comprende la detección, en una muestra de dicho sujeto, de los niveles de expresión de uno o más miARN seleccionados del siguiente grupo: SEQ ID NO: 1 (miR107); SEQ ID NO: 2 (miR337-5p); SEQ ID NO: 3 (miR564); SEQ ID NO: 4 (miR605); SEQ ID NO: 5 (miR889); SEQ ID NO: 6 (miR99a*).

30 Los inventores han demostrado que los niveles de uno o más de estos miARN pueden ser indicativos de una falta de respuesta, o de la respuesta de un

sujeto. En una realización, la respuesta es una respuesta a la reducción de la carga tumoral. En una realización alternativa, la respuesta es una mejora o ausencia de deterioro del estado del tumor. En otra realización, la respuesta es un resultado clínico, tal como la supervivencia exenta de progresión o la supervivencia global.

El procedimiento para determinar el resultado, es decir, el nivel de expresión del miARN no está particularmente limitado y puede seleccionarse a partir de un procedimiento de perfilado génico, tal como una micromatriz, y/o un procedimiento que comprende la PCR, tal como la PCR en tiempo real y/o la transferencia Northern. Se prefiere la PCR en tiempo real, y los valores con respecto a un valor de referencia indicativo de la falta de respuesta se pueden expresar como $-\Delta\Delta Ct$.

Se prefiere que el sujeto cuya respuesta se va a predecir se haya sometido a cirugía del tumor, es decir, la resección quirúrgica del cáncer antes de la aplicación del procedimiento de la invención. Es posible que en el momento de tomar la muestra del sujeto humano, el sujeto humano esté (i) siendo tratado mediante quimioterapia, o (ii) no esté siendo tratado mediante quimioterapia, pero, se prefiere (ii). De esta manera, se puede predecir la respuesta a la quimioterapia tras la cirugía. La respuesta a la quimioterapia que se puede predecir comprende preferiblemente la administración de fluoropirimidina, sola o en combinación con un agente adicional. En realizaciones particulares de la presente invención, la quimioterapia puede comprender la administración de oxaliplatino y fluoropirimidina, o de irinotecán y fluoropirimidina.

En el procedimiento de la presente invención, la expresión del miARN puede estar normalizada, preferiblemente en relación con la expresión de otra molécula de ARN, tal como MammU6.

La invención proporciona también un procedimiento para clasificar un sujeto humano que padece cáncer colorrectal metastásico en uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende sujetos identificables mediante el procedimiento de la invención; y en el que el grupo 2 representa el resto de

sujetos. Es posible proporcionar una terapia personalizada a un individuo, dependiendo de si el individuo se ha clasificado en el grupo 1 o en el grupo 2.

De esta manera, la presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende fluoropirimidina y un agente
5 adicional, seleccionado entre oxaliplatino e irinotecán, para tratar un sujeto humano del grupo 1.

Además, la invención proporciona un anticuerpo para tratar a un sujeto humano del grupo 2. El anticuerpo se selecciona preferiblemente a partir de un anticuerpo dirigido contra VEGF y un anticuerpo dirigido contra EGFR. El
10 anticuerpo dirigido contra VEGF puede ser bevacizumab, y el anticuerpo dirigido contra EGFR se puede seleccionar entre cetuximab and panitumumab.

La presente invención proporciona también un kit que comprende al menos un(os) oligonucleótido(s) capaces de hibridarse con uno cualquiera o más, preferiblemente dos o más, y aún más preferible con todos los miARNs
15 que se definen como SEQ ID NOs: 1 a 6. Se prefiere que dicho(s) oligonucleótido(s) sea(n) capaz(ces) de hacerlo en condiciones rigurosas (stringent conditions). En una realización preferida, uno o más de dicho uno o más oligonucleótido(s) (ADN preferiblemente) se definen adicionalmente mediante las siguientes SEQ ID NOs: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 SEQ ID
20 NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12. Es también posible que dicho kit comprenda adicionalmente un cebador de poli T oligonucleótido (ADN). Es también posible que el(los) oligonucleótido(s) se inmovilicen en manchas sobre una superficie (preferiblemente sólida). En aún otra realización de la invención, el kit comprende una micromatriz.

25 El uso del kit no está particularmente limitado, aunque se prefiere su uso en el procedimiento de la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Gráfico volcán de los miARN expresados diferencialmente entre con respuesta y sin respuesta a la quimioterapia. El log₂ del cambio de
30 veces se representa en el eje x y el logaritmo negativo de los valores p del test de la t se representa en el eje y. La línea negra rayada muestra el punto en que

$p = 0,05$, teniendo los puntos por encima de la línea $p < 0,05$ y teniendo los puntos por debajo de la línea $p > 0,05$.

Figura 2. Resultado clínico en pacientes con respuesta o sin respuesta a la quimioterapia de acuerdo con el estado de expresión de los miARN. (A) Supervivencia exenta de progresión (PFS) y (B) supervivencia global mediante los niveles de expresión de los miARN. La línea negra sólida muestra los pacientes con niveles de miARN por encima o iguales al valor promedio de ΔCt . La línea negra punteada muestra los pacientes con niveles de miARN por debajo del valor promedio de ΔCt .

Figura 3. Resultado clínico en pacientes con respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable y enfermedad progresiva sobre la base de los niveles de expresión de los miARN. (A) supervivencia exenta de progresión (PFS) y (B) supervivencia global mediante los niveles de expresión de los miARN. La línea negra sólida muestra los pacientes con niveles de miARN por encima o iguales al valor promedio de ΔCt . La línea negra punteada muestra los pacientes con niveles de miARN por debajo del valor promedio de ΔCt .

Figura 4. Comparación del valor promedio de ΔCt en pacientes con respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), enfermedad estable (SD) frente a enfermedad progresiva. *valor de $p < 0,05$. La parte superior y la parte inferior del recuadro son siempre los percentiles 25 y 75 y la banda próxima a la mitad del recuadro es siempre el percentil 50.

Figura 5. Comparación de los resultados obtenidos de pacientes con cáncer colorrectal avanzado estratificados como R y NR y los obtenidos en CR, PR, SD y PD.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la predicción de la respuesta de un sujeto humano a la quimioterapia, en el que el sujeto padece cáncer colorrectal avanzado, tal como cáncer colorrectal metastásico (MCRC). Tal como se ha dicho anteriormente, el cáncer colorrectal avanzado (CRC o ACC avanzado) se puede definir como cáncer colorrectal que en la

presentación (o recurrencia) es tanto (i) metastásico como que (ii) está tan avanzado localmente que es improbable que se lleve a cabo la resección quirúrgica con intención curativa. El cáncer colorrectal metastásico (MCRC) está incluido en la definición de CRC avanzado.

5 El diagnóstico del cáncer colorrectal se puede llevar a cabo mediante la biopsia del tumor, y la extensión de la enfermedad se determina a continuación usualmente mediante un barrido CT u otras pruebas de formación de imágenes. A continuación, se determina la etapa del cáncer de colon, basándose preferiblemente en el sistema TNM que está determinado por la
10 cantidad en que se ha diseminado el tumor inicial, y si los nódulos linfáticos están afectados y, si existe metástasis, cuánto se ha desarrollado. De esta manera, para el procedimiento de la presente invención, el sistema de estadificación TNM, que sitúa a pacientes en una de cuatro etapas (Etapa I–IV), tal como desarrolló el American Joint Committee on Cancer (AJCC Cancer
15 Staging Manual, 7a edición) se usa preferiblemente para definir la etapa o la gravedad del CRC en un sujeto concreto o para clasificar un sujeto particular en un grupo concreto (I-IV). El sistema TNM evalúa el tumor primario (T), los nódulos linfáticos regionales (N) y la metástasis distante (M). El American Joint Committee on Cancer y la International Union for Cancer Control actualizan
20 periódicamente el sistema de estadificación tumor–nódulo–metástasis (TNM) del cáncer, basándose en los avances en la comprensión de los avances del pronóstico del cáncer actuales y relevantes para la práctica clínica. En una realización particular, se puede usar la estadificación tal como se describe en las NCCN Guidelines Versión 2.2012 Staging Colon Cancer, disponible por
25 ejemplo en línea en NCCN (www.nccn.org). Las categorías TNM reflejan resultados muy similares para el cáncer rectal y de colon. Por tanto, estas dos enfermedades comparten el mismo sistema de estadificación (Gunderson y *col.*, J Clin Oncol. 10 de enero de 2010; 28(2):256-63).

30 En la presente invención, el procedimiento se puede llevar a cabo en sujetos con cualquier etapa de cáncer colorrectal, aunque se prefiere que se lleve a cabo en pacientes con una etapa avanzada, tales como con pacientes

del grupo que comprende cualquiera de las etapas II, III o IV, y preferiblemente con pacientes del grupo que comprende cualquiera de las etapas III o IV, y lo más preferible, con pacientes que padezcan de cáncer colorrectal en la etapa IV. En una realización particular, el perfil determinado por la presente invención es más bien predictivo en lugar de pronóstico y diagnóstico. El cáncer colorrectal metastásico se define como un tipo de cáncer colorrectal avanzado, y el procedimiento de la invención se lleva a cabo preferiblemente con sujetos que padecen cáncer colorrectal avanzado.

Los sujetos cuya respuesta se predice son sujetos humanos que padecen CRC. Los términos "sujeto humano", "sujeto" y "paciente" se usan por tanto de manera indistinta en esta memoria descriptiva.

"Uno o más" tal como se usa también en la presente memoria descriptiva incluye uno y la especificación individualizada de cualquier número que sea más de uno, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc. "Más de uno" o "algunos" tal como se usa en la presente memoria descriptiva incluye la especificación individualizada de cualquier número que sea más de uno, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc.

El procedimiento de la invención comprende la detección, en una muestra procedente de un sujeto humano, de los niveles de expresión de uno o más miARNs particulares. Ejemplos ilustrativos no limitantes de dichas muestras incluyen diferentes tipos de muestras de tejidos, así como de fluidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, fluido peritoneal, heces. Preferiblemente, dichas muestras son muestras de tejidos y lo más preferible, dichas muestras de tejidos se originan de tejido del tumor CRC del individuo cuya respuesta se va a predecir y se pueden originar a partir de biopsias, preferiblemente provenientes de resección quirúrgica.

A no ser que se especifique expresamente de otra forma, el término "que comprende" se usa en el contexto de este documento para indicar que pueden estar opcionalmente presentes miembros adicionales además de los miembros de la lista introducida por el término "que comprende". Se contempla, sin embargo, como una realización específica de la presente invención que el

término “que comprende” abarque la posibilidad de que no se encuentren presentes miembros adicionales, es decir, a los fines de esta realización “que comprende” debe entenderse que tiene el significado de “que consiste en”.

Los presentes inventores han investigado la asociación entre el perfil de
5 expresión del miARN y el cáncer colorrectal en pacientes que reciben quimioterapia tras cirugía, lo que permite su uso como factor predictivo en la supervivencia exenta de progresión y la supervivencia global de pacientes que padecen cáncer colorrectal, así como como factores predictivos para el éxito de la quimioterapia (respuesta a la quimioterapia). En una realización particular,
10 los pacientes padecen cáncer colorrectal en la etapa IV.

Los microARN son ARN monocatenarios de ~22-nucleótidos (aprox. 18–25 nucleótidos) y regulan negativamente (inhiben) la expresión génica mediante la inhibición de la traducción o la escisión del ARNm. De esta manera, los miARN son reguladores postranscripcionales que se unen a
15 secuencias complementarias en las transcripciones de ARN mensajeros diana (ARNm), dando como resultado la represión de la traducción o la degradación de la diana y el silenciamiento del gen. En un aspecto particular de la invención, la comprensión de los detalles moleculares de la acción de los miARN de la invención no es crítica, debido a que los niveles detectados de los
20 miARN indicadores solo permiten llevar a cabo el procedimiento de la invención.

En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento que implica el uso del conjunto de miARNs consistente en: SEQ ID NO: 1 (miR107); SEQ ID NO: 2 (miR337-5p); SEQ ID NO: 3 (miR564); SEQ ID NO: 4 (miR605);
25 SEQ ID NO: 5 (miR889); SEQ ID NO: 6 (miR99a*). En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de cualquier subconjunto de estos miARNs.

Tabla 1A: Secuencias de miARN

MicroARN	SEQ ID NO	MIID	Ubicación de la Seq. Tallo bucle	Sanger ID Madura	Secuencia Madura
<u>hsa-miR-107</u>	1	MI0000114	50..72	MIMAT0000104	agcagcauuguac agggcuauc
<u>hsa-miR-337-5p</u>	2	MI0000806	23..43	MIMAT0004695	gaacggcucaua caggagu
<u>hsa-miR-564</u>	3	MI0003570	16..34	MIMAT0003228	aggcacgguguca gcagg
<u>hsa-miR-605</u>	4	MI0003618	16..38	MIMAT0003273	uaaaucCCAUGGU GCCUUCUCC
<u>hsa-miR-889</u>	5	MI0005540	49..69	MIMAT0004921	uuaauaucggaca accAUUG
<u>hsa-miR-99a*</u>	6	MI0000101	50..71	MIMAT0004511	caagcucgcuucua ugggucu

Tabla 1B: Ubicación de los miARN.

MicroARN	SEQ ID NO	Chr	Inicio	Fin	Cadena	Banda
<u>hsa-miR-107</u>	1	10	91342480	91342566	-1	q23.31
<u>hsa-miR-337-5p</u>	2	14	100400000	100400000	1	q32.31
<u>hsa-miR-564</u>	3	3	44878384	44878477	1	p21.31
<u>hsa-miR-605</u>	4	10	52729339	52729421	1	q11.23
<u>hsa-miR-889</u>	5	14	100600000	100600000	1	q32.31
<u>hsa-miR-99a*</u>	6	21	16833280	16833360	1	q21.1

A lo largo de la presente descripción, los inventores proporcionan evidencias mediante análisis univariante y multivariante de que existe un

conjunto solapante de miARNs cuya determinación es predictiva tanto del resultado clínico de un sujeto sometido a quimioterapia como de la respuesta de la carga tumoral de un sujeto a la quimioterapia, véase el Ejemplo 3. De esta manera, mediante dos enfoques diferentes (Ejemplo 1 frente al Ejemplo 2), los inventores proporcionan evidencias del poder predictivo de los miARNs de la invención.

En un sistema de nomenclatura normalizado, los nombres se asignan a miARN experimentalmente como sigue: el prefijo "mir" está seguido (por un guión y) un número, en donde el último puede indicar el orden de nomenclatura. El "mir-" en minúscula se refiere al pre-miARN, mientras que un "miR-" en mayúscula se refiere a la forma madura. Los miARN con secuencias casi idénticas, excepto uno o dos nucleótidos, se indican letras minúsculas adicionales, por ejemplo miR99a*. Los pre-miARN que conducen a miARN maduros 100% idénticos pero que se localizan en diferentes lugares en el genoma se indican con un sufijo numérico adicional separado por guión. Se puede designar la especie original con un prefijo de tres letras, por ejemplo, hsa-miR-123 es un miARN humano (*Homo sapiens*). Debido a que en el contexto de este documento, todos los miARN individualizados son miARN humanos, el prefijo "hsa-" se omite algunas veces. Cuando dos microARN se originan de brazos opuestos del mismo pre-miARN, se denotan con un sufijo -3p o -5p, tal como por ejemplo miR337-5p. Cuando se conocen niveles de expresión relativos, un asterisco tras el nombre indica un miARN expresado a bajos niveles con respecto al miARN en el brazo opuesto de una horquilla, por ejemplo miR99a*. La mayoría de genes de miARN conocidos se encuentran en regiones intergénicas o están orientados en sentido contrario a los genes adyacentes y se piensa, por tanto, que se transcriben como unidades independientes. Sus genes se transcriben usualmente mediante la ARN polimerasa II y los transcritos procesados, exportados desde el núcleo y procesados adicionalmente mediante maquinarias específicas, como se conoce bien en la técnica (véase por ejemplo. He y col., *Nat. Rev. Genet.* Jul 2004; 5(7):522-31). Se puede acceder a las secuencias de miARN en

<http://www.mirbase.org>.

Es un inconveniente del valor predictivo de muchos análisis convencionales basados en los modelos de expresión del miARN que los miARNs subyacentes solo se expresen a menudo a niveles bajos o incluso no detectables. Dichos miARNs tienen un valor limitado para el pronóstico, en el mejor de los casos. Los miARNs a los que se refiere la presente invención son sin embargo normalmente detectables en un 50 % o más, tal como 60 % o más, 70 % o más u 80 % o más de pacientes de ambos grupos comparados (R (pacientes que muestran respuesta a la quimioterapia “respondedores”) y NR (pacientes que no muestran respuesta a la quimioterapia “no respondedores”). En los ejemplos de la presente invención, sin embargo, se consideró la diferencia de la expresión de los miARNs para la evaluación cuando se detectaron el menos en un 50% de pacientes de ambos grupos comparados (R y NR). Se escogió este umbral debido a que representa al menos la mitad de los pacientes. Tal como se muestra en los ejemplos, la expresión de miR-107, miR-337-5p, miR-564, miR-605, miR-889 y miR-99a*, se detectó en un 92,8% de los sujetos estudiados, lo que evidencia la adecuación de estos miARN para el procedimiento predictivo de la presente invención. El procedimiento de la presente invención es de esta manera particularmente fiable en términos de las moléculas indicadoras (los miARN concretos).

El hecho de que las presente invención use miARN (es decir, ARN muy cortos y bien definidos) como factores indicadores tiene la ventaja de una detección fácil y fiable, al contrario que algunos procedimientos conocidos, tales como los descritos por el documento US 20110039269 A1, por ejemplo, que se basa en los ARN mensajeros (ARNm) para evaluar la supervivencia del paciente con CRC. Las moléculas de ARNm tienen normalmente un tamaño de varios cientos o incluso varios miles de bases; dichas moléculas grandes y al mismo tiempo delicadas son propensas generalmente a la degradación, y su detección depende de la elección (a menudo ensayo y error) de la sonda apropiada, lo que convierte dichos ensayos a *primera vista* en menos fiables que los procedimientos de la presente invención.

Los miARN indicadores del procedimiento de la presente invención son uno o más de los seleccionados entre el grupo que consiste en los que se han definido mediante las siguientes SEQ ID NOs: SEQ ID NO: 1 (miR107); SEQ ID NO: 2 (miR337-5p); SEQ ID NO: 3 (miR564); SEQ ID NO: 4 (miR605); SEQ ID NO: 5 (miR889); SEQ ID NO: 6 (miR99a*). Los inventores han evidenciado que estos miARNs son indicadores predictivos de la respuesta de un sujeto que padezca CRC a quimioterapia (véase por ejemplo el Ejemplo 3, Figura 5). El procedimiento implica la comparación de los niveles de expresión de dichos miARNs con los niveles de expresión de dichos miARNs en una muestra de referencia o con los niveles promedios de expresión de dichos miARNs. En el contexto de la presente invención, se entiende "muestra de referencia" como la muestra que se usa para determinar la variación de los niveles de expresión de los miARNs de la presente invención. En una realización de la invención, el valor de referencia se obtiene a partir de la señal proporcionada usando una muestra de tejido obtenida de un individuo que es un no respondedor. Preferiblemente, las muestras se toman del mismo tejido de varios individuos no respondedores y se combinan, de tal manera que el valor de referencia refleja el valor promedio de dichas moléculas en la población de no respondedores. "Valor de referencia" es el nivel de expresión de un miARN de la invención en la muestra de referencia. El valor de referencia indicativo de la no respuesta para cada miARN concreto debe conocerse antes de llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. Se prefiere que la muestra de referencia sea del mismo tejido y/u obtenida mediante el mismo procedimiento (opciones descritas anteriormente) que la muestra a partir de la cual se va a predecir la respuesta del individuo. Se prefiere que la muestra se origine a partir de la misma etapa o gravedad del CRC que la muestra a partir de la cual se va a predecir la respuesta del individuo. De esta manera, si se va a predecir la respuesta de un paciente que padezca CRC con un cancer tipo IV (que es una manera preferida de llevar a cabo la invención), entonces, la muestra de referencia sería también la de un paciente no respondedor que padezca de CRC tipo IV o en la etapa IV.

La respuesta puede referirse a las características de los tumores del sujeto. De manera alternativa pero no mutuamente excluyente, la respuesta puede referirse al resultado clínico del sujeto.

De esta manera, mediante el procedimiento de la invención, se puede predecir si un paciente individual mostrará (i) una respuesta (R) a la quimioterapia o (ii) no mostrará respuesta (NR) a la quimioterapia.

Siempre que la respuesta se refiera a las características de los tumores del sujeto, la distinción entre R y NR se puede llevar a cabo sobre la base del cambio en el tamaño de la lesión. Por ejemplo, se puede definir "Respuesta" como una disminución en la carga total del tumor (definida como la suma de las áreas del tumor de lesiones medidas bidimensionalmente), tomando como referencia los valores correspondientes al valor inicial, sin la aparición de una nueva lesión. De manera particular, la respuesta puede ser $\geq 5\%$ de disminución en la carga total del tumor, tal como $\geq 10\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 15\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 20\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 25\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 30\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 35\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 40\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 45\%$ de disminución en la carga total del tumor o $\geq 50\%$ de disminución en la carga total del tumor, definida cada una como la suma de las áreas del tumor de las lesiones medidas bidimensionalmente. En una realización preferida de la presente invención, la respuesta se define como $\geq 30\%$ de disminución en la carga total del tumor (definida como la suma de las áreas del tumor de las lesiones medidas bidimensionalmente), tomando como referencia los valores correspondientes a los valores iniciales, sin la aparición de una nueva lesión. La falta de respuesta (NR) se define de forma contraria a (R). Preferiblemente, sin respuesta (NR) se define como $< 30\%$ de disminución en el área del tumor de una o más lesiones medibles, o la aparición de al menos una nueva lesión. Esto incluye normalmente un aumento, tal como $> 20\%$ de aumento en el área de una o más lesiones medibles o la aparición de al menos una nueva lesión.

Los inventores han demostrado que, cuando se define la respuesta como disminución en la carga total del tumor, los niveles de expresión de uno o más miARNs tal y como se definen en las SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6 son buenos indicadores predictivos de dicha respuesta.

5 En concreto, dichos niveles de expresión indican una disminución en la carga total del tumor si: (i) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 1 han aumentado; y/o (ii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 2 han aumentado; y/o (v) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 5 han disminuido; y/o (vi) los niveles del
10 miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 6 han aumentado con referencia a un valor control indicador de la falta de respuesta. Esto se aplica particularmente si la respuesta se define como $\geq 30\%$ de disminución en la carga total del tumor.

Siempre que "Respuesta" se refiera al resultado clínico del sujeto, se
15 puede expresar la "Respuesta" como la supervivencia global o la supervivencia exenta de progresión. La supervivencia de pacientes de cáncer se expresa de manera adecuada generalmente mediante las curvas de Kaplan-Meier, que han recibido su denominación de Edward L. Kaplan y Paul Meier que fueron los que describieron éstas en primer lugar (Kaplan, Meier: Amer. Statist. Assn. 53:457–
20 481). El estimador Kaplan–Meier se conoce también como el estimador límite del producto. Sirve para estimar la función de supervivencia a partir de los datos del tiempo de vida. Una representación gráfica de la estimación de Kaplan–Meier de la función de supervivencia es una serie de etapas
25 horizontales de magnitud decreciente que, cuando se toma una muestra suficientemente grande, se aproxima a la función de supervivencia verdadera de esta población. El valor de la función de supervivencia entre sucesivas observaciones muestreadas distintas se supone que es constante. En la estadística en la que se basa la presente invención, los pacientes de CRC se agrupan en categorías, por ejemplo, aquellos con un perfil de expresión
30 concreto tal como el perfil de expresión de un miARN particular y aquellos sin dicho perfil. Con respecto a la presente invención, se puede usar el estimador

de Kaplan-Meier para medir la fracción de pacientes vivos a lo largo de un espacio de tiempo tras comenzar la quimioterapia. El resultado clínico previsto puede ser la supervivencia (global/exenta de progresión) en meses/años desde el momento de tomar la muestra. Puede ser la supervivencia durante un cierto periodo de tiempo desde la toma de la muestra, tal como, de seis meses o más, un año o más, dos años o más, tres años o más, cuatro años o más, cinco años o más, seis años o más. En cada caso, la "supervivencia" puede referirse a la "supervivencia global" o a la "supervivencia exenta de progresión".

De esta manera, en una realización de la invención, la respuesta se basa en el resultado clínico, concretamente en la "supervivencia global" (OS). La "supervivencia global" denota las posibilidades de un paciente de CRC de seguir vivo en un grupo de individuos que padecen cáncer. La cuestión decisiva es si el individuo muere o vive en un momento dado. Los inventores han demostrado que todos los miARNs de la invención son indicadores de supervivencia global. En particular, cuando en el procedimiento de la invención el resultado clínico es la supervivencia global, el resultado del procedimiento de la invención es indicador de la supervivencia global si se observan uno o más de los siguientes hechos: (i) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 1 han aumentado; y/o (ii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 2 han aumentado; y/o (iii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 3 han aumentado; y/o (iv) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 4 han disminuido; y/o (v) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 5 han disminuido; y/o (vi) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 6 han aumentado, cada uno con respecto al valor promedio, donde el valor promedio se calcula a partir de todos los valores de expresión del miARN tal y como se ilustra en el ejemplo 4B.

En el Ejemplo 4 B se proporciona el valor promedio determinado por los presentes inventores. De esta manera, los valores promedio proporcionados en el Ejemplo 4 B se pueden usar en esta realización de la invención.

Se entenderá fácilmente que, debido a que estas alteraciones

(aumento/disminución) de los valores son predictivas *con respecto al valor ΔCt promedio*, (i) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 1 si aumentan; y/o (ii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 2, si aumentan; y/o (iii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 3, si aumentan; y/o (iv) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 4, si disminuyen; y/o (v) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 5, si disminuyen; y/o (vi) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 6, si aumentan *con respecto al valor de referencia indicador de la falta de supervivencia*, son también indicadores de supervivencia global.

En una realización alternativa, la respuesta se basa en el resultado clínico, concretamente en la "supervivencia exenta de progresión" (PFS). La supervivencia exenta de progresión (PFS) es el plazo de tiempo durante y después de la medicación o tratamiento durante el cual, el CRC que se está tratando mediante la quimioterapia no empeora. El tema decisivo en esta realización es si el individuo que padece CRC muestra una disminución en la carga del tumor (tal como se ha descrito anteriormente) en un momento dado. Los presentes inventores han demostrado que los valores del miARN de la invención son indicadores de la falta de respuesta si se observan uno o más de los siguientes: (i) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 1 han aumentado; y/o (ii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 2 han aumentado; y/o (iv) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 4 han disminuido; y/o (vi) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 6 han aumentado, cada uno con referencia al valor promedio (véase el Ejemplo 4 B), donde el valor promedio se calcula a partir de todos los valores de expresión de los miARNs respectivos. Se entenderá fácilmente que, debido a que estas alteraciones de los valores son predictivas *con respecto al valor promedio*, (i) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 1, si aumentan; y (ii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 2, si aumentan; y (iv) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 4, si disminuyen; y

(vi) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 6, si aumentan *con respecto a un valor de referencia indicador de la falta de PFS*, son también indicadores de PFS.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de predicción de la respuesta completa y/o la respuesta parcial de un sujeto humano a la quimioterapia, en el que el sujeto padece cáncer colorrectal metastásico, y en el que el procedimiento comprende detectar, en una muestra de un sujeto, los niveles de expresión que comprenden uno o más miARNs de la invención. En particular, los inventores proporcionan evidencias de que se pueden usar los niveles de expresión de uno o más miARNs tal como se ha definido en las SEQ ID NOs: 1, 2, 4 como indicadores, y que el resultado es indicador de la respuesta completa o la respuesta parcial de un sujeto humano si se observan uno o más de los siguientes hechos: (i) los niveles del miARN tal como se ha indicado en la SEQ ID NO: 1 han aumentado; y/o (ii) los niveles del miARN tal como se ha indicado en la SEQ ID NO: 2 han aumentado; y/o (iv) los niveles del miARN tal como se ha indicado en la SEQ ID NO: 4 han disminuido, con respecto a un valor de referencia indicador de la enfermedad progresiva. La presente invención proporciona valores de referencia de la enfermedad progresiva, tal y como se ha determinado por los autores, en el Ejemplo 4 C.

La evaluación de la respuesta completa y/o la respuesta parcial es un factor importante para determinar el estado de un paciente individual. De esta manera, es necesario estimar la carga total del tumor en el valor inicial y usar ésta como elemento comparador para las posteriores medidas que se llevan a cabo normalmente de acuerdo con las directrices RECIST revisadas, Eisenhauer y *col.*, Eur. J. Cancer, 45 (2009) 228–247 (versión 1.1.), en particular las definiciones de los criterios utilizados para determinar la respuesta, las proporciona Eisenhauer y *col.* de acuerdo con las siguientes definiciones:

1. Respuesta Completa (CR): Desaparición de todas las lesiones diana. Cualquier nódulo linfático patológico (tanto diana como no diana) debe tener reducción en el eje hasta <10 mm.

2. Respuesta Parcial (PR): Al menos una disminución del 30% en la suma de diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia el valor inicial de la suma de diámetros.

3. Enfermedad Progresiva (PD): Al menos un aumento del 20% en la suma de diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia la suma más pequeña en el estudio (esto incluye el valor inicial de la suma si este es el más pequeño del estudio). Además del aumento relativo del 20%, la suma debe también demostrar un aumento absoluto de al menos 5 mm. (Nota: la aparición de una o más nuevas lesiones se considera también progresión).

4. Enfermedad Estable (SD): Ni una disminución suficiente para calificarla como PR ni un aumento suficiente para calificarla como PD, tomando como referencia la suma de diámetros más pequeña durante el estudio.

A lo largo de la presente invención, los terminos CR, PR, PD y SD se definen de acuerdo con las definiciones 1 a 4 anteriores tomadas de las Directrices RECIST revisadas de Eisenhauer y *col.*, Eur. J. Cancer, 45 (2009) 228–247.

En cualquiera de las realizaciones de la presente invención, el procedimiento para determinar el resultado, es decir, la determinación del nivel de expresión de los miARNs no necesita limitarse de manera particular y se puede seleccionar a partir de un procedimiento de perfilado génico, tal como una micromatriz y/o un procedimiento que comprenda la PCR, tal como la PCR en tiempo real; y/o la transferencia Northern. La PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) es una técnica de cuantificación de la expresión génica sensible y reproducible que se puede usar de manera particular para la expresión del perfil del miARN en células y tejidos. Se puede usar cualquier procedimiento para la evaluación de los resultados de la RT-PCR y se puede preferir el procedimiento $\Delta\Delta\text{Ct}$. El procedimiento $\Delta\Delta\text{Ct}$ se describe en detalle en Livak y *col.* (Methods 2001, 25:402-408). (Ct = Valores umbral del ciclo). Cuando se lleva la presente invención a la práctica, se deberá usar preferiblemente el procedimiento $\Delta\Delta\text{Ct}$ tal como describen Livak y *col.* (Methods 2001, 25:402-408). El procedimiento $\Delta\Delta\text{Ct}$ implicará una "muestra del control" y una "muestra

del sujeto". La "muestra del sujeto" es una muestra procedente del sujeto que se va a analizar. Por cada muestra, se incluyen un gen diana (aquí: el miARN de interés) y un gen endógeno del control (tal como se describe a continuación) para la amplificación de la PCR a partir de alícuotas (normalmente diluciones en serie). Normalmente se usan varias réplicas de cada concentración diluida para derivar la eficacia de la amplificación. La eficacia de la amplificación de la PCR se puede definir como el porcentaje de amplificación (de 0 a 1). Durante la reacción de la qPCR, un software mide normalmente el número de ciclos de cada muestra en el cual la fluorescencia cruza una línea arbitraria (indicadora de la amplificación de la PCR), el umbral. Este punto de cruce es el valor Ct. Muestras más diluidas cruzarán a valores Ct posteriores. Para cuantificar la expresión génica del miARN, se divide el Ct de un ácido nucleico procedente del miARN del gen de interés por el Ct del ácido nucleico procedente del control endógeno en la misma muestra para normalizar la variación en la cantidad y calidad del ARN entre diferentes muestras y obtener la expresión relativa (con respecto al control endógeno) de cada una de la "muestra del sujeto" y de la "muestra del control". Opcionalmente, esto se lleva a cabo por duplicado, triplicado, cuádruplicado y de manera similar, respectivamente. Se puede obtener de manera adecuada un valor ΔCt del control calculando el promedio de los valores ΔCt obtenidos a partir de muestras de un grupo del control de varios individuos con los cuales se van a comparar los valores de la "muestra del sujeto". El grupo del control (del cual se calcula el valor promedio) consiste en los individuos adecuados a los respectivos fines (de comparación). La persona experta aprenderá de esta divulgación que un grupo de control adecuado es para un fin concreto (por ejemplo, en el caso del Ejemplo 4 A, el grupo del control consiste en sujetos sin respuesta, en el caso del Ejemplo 4 B, el grupo del control consiste en todos los sujetos y en el Ejemplo 4 C, el grupo del control consiste en los sujetos con enfermedad progresiva o con respuesta parcial. En una realización particular, la presente invención se puede llevar a la práctica omitiendo la determinación del valor ΔCt del grupo del control, es decir, determinar (solo) el valor ΔCt de la "muestra del sujeto" y a continuación

comparando posteriormente este con el respectivo valor ΔCt promedio del control indicado en el Ejemplo 4 (A, B, C, respectivamente).

En la presente invención los cálculos de $\Delta\Delta Ct$ expresan la expresión relativa en el contexto de la "muestra del sujeto" frente a la "muestra del control" (o el promedio de las muestras del control descrito anteriormente). La cantidad de miARN diana, normalizada a una referencia endógena y con respecto a una muestra del control (promedio), se proporciona por: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Por ejemplo: si el primer valor (por ejemplo, el sujeto) es mayor que el segundo valor ΔCt (por ejemplo (promedio) control), entonces, el valor de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ será <1. Esto implica que la expresión relativa en la segunda muestra se redujo con respecto a la primera muestra. Tomando la inversa negativa de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ se proporcionará el cambio de veces de reducción de la expresión. Se pueden encontrar también detalles del procedimiento de cálculo del $\Delta\Delta Ct$ en: Applied Biosystems user Bulletin N° 2 (P/N 4303859).

Una micromatriz es una matriz sobre un sustrato sólido (normalmente un porta de vidrio o una celda con una película fina de silicio) que evalúa grandes cantidades de material biológico, en el presente caso, una gran cantidad de miARN diferentes o, preferiblemente, sus transcritos de ADN inverso, que son detectables mediante sondas inmovilizadas específicas sobre el sustrato sólido.

Una transferencia Northern implica el uso de electroforesis para separar muestras de ARN por tamaño y la posterior detección con una sonda complementaria a (parte de) la secuencia diana del ARN de interés.

En algunos casos, para cada uno de los miARN del procedimiento de la invención, se considera significativa una relación de expresión de los miARN (sujeto a ser el valor previsto/de referencia), según sea detectable mediante el análisis de la RT-PCR en tiempo real, de 0,9 o inferior, tal como de 0,8 o inferior, o de 0,75 o inferior.

Se prefiere que el sujeto al cual se le va a predecir la respuesta haya experimentado la cirugía del tumor, es decir, la resección quirúrgica del cáncer antes de la aplicación del procedimiento de la invención. Las opciones para la cirugía incluyen, pero no se limitan a, (a) colectomía parcial (el cirujano elimina

solo parte del colon) (b) ileocolectomía (se elimina el íleo) (c) resección abdominoperineal (operación quirúrgica en la que se eliminan el ano, el recto y el colon sigmoideo), (d) proctosigmoidectomía (se elimina la sección enferma del recto y el colon sigmoideo), (e) colectomía abdominal total (elimina el colon completo pero preserva el recto y el ano), (f) proctocolectomía total (operación del intestino grueso que implica la eliminación del recto y el colon). No se excluye que se usen otros tratamientos tales como la radiación junto con la cirugía.

Es posible que en el momento de tomar la muestra del sujeto humano, el sujeto humano esté (i) siendo tratado con quimioterapia o (ii) no esté siendo tratado con quimioterapia. Se prefiere la opción (ii). En este sentido, se prefiere la siguiente secuencia de pasos: (a) pacientes que experimentan la cirugía del cáncer colorrectal, (b) a partir de la cirugía, se extrae una muestra reciente del tumor para el análisis del miARN, (c) (opcional) se tratan los pacientes mediante quimioterapia, tal como con quimioterapia basada en fluoropirimidina más oxaliplatino o irinotecán. El aislamiento de la muestra del sujeto vivo como tal no es también una parte de la invención. La cirugía de un cuerpo humano vivo como tal no es también una parte de la invención. Lo que es una parte de la invención es el procedimiento *in vitro* para determinar el nivel de expresión del miARN de la invención en una muestra que se ha obtenido mediante las etapas (a) y (b). De esta manera, el procedimiento para predecir una respuesta de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un procedimiento *in vitro*.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "tratamiento" o "tratar" significan la administración de un agente para evitar, aliviar o eliminar el CRC o de uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad. "Tratamiento" incluye también evitar, aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad. En el contexto de esta invención, el término "aliviar" se entiende que significa cualquier mejora de la situación del paciente tratado, de manera subjetiva (los sentimiento de o acerca del paciente) y de manera objetiva (los parámetros medidos). En la práctica, la etapa (b) comprende normalmente: (b1)

la extracción del ARN (total) o del miARN (total) procedentes de la muestra reciente del tumor, y los procedimientos adecuados para este fin no están particularmente limitados. Esta comprende también normalmente la etapa (b2), es decir, la detección de los niveles de los miARN de interés entre el ARN
5 extraído en (b1). Estos procedimientos, a modo de ejemplo, se proporcionan en los materiales y metodos situados al final de la parte descriptiva (Ejemplos).

La quimioterapia, la respuesta a la cual se va a prever, puede ser cualquier tipo de quimioterapia adecuada para tratar a pacientes de cáncer colorrectal. Se entiende la quimioterapia como tratamiento del cáncer con un
10 fármaco antineoplásico o con una combinación de dichos fármacos. Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría particular, se entiende que la quimioterapia actúa normalmente eliminando células que se dividen rápidamente, lo que es una de las propiedades principales de la mayor parte de células cancerosas. Para el tratamiento de los pacientes de cáncer colorrectal,
15 la quimioterapia comprende preferiblemente la administración de compuestos de fluoropirimidina, que se piensa que actúan como antimetabolitos. Los ejemplos de compuestos de fluoropirimidina son capecitabina, floxuridina, y fluorouracilo (5-FU), que es el más preferido en la presente invención. Dicha fluoropirimidina se puede administrar sola o en combinación con un agente
20 adicional, por consiguiente, se prefiere la combinación con un agente adicional. El agente adicional puede ser una molécula capaz de interactuar con el ADN, tal como en la inhibición de la síntesis de ADN y/o en prevenir el desenrollado del ADN. En una realización preferida de la presente invención, la quimioterapia puede comprender la administración de oxaliplatino y
25 fluoropirimidina, o de irinotecán y fluoropirimidina. Se piensa que la citotoxicidad del oxaliplatino (documento US 4.169.846) da como resultado la inhibición de la síntesis del ADN en células cancerosas. Los estudios *in vivo* han mostrado que oxaliplatino presenta actividad antitumoral frente al carcinoma de colon por su efecto citotóxico (no dirigidos). Irinotecán por otra
30 parte es un análogo semisintético del alcaloide natural camptotecina, que se piensa que actúa evitando el desenrollado del ADN mediante la inhibición de la

topoisomerasa 1. De esta manera, oxaliplatino e irinotecán se piensa que ejercen su función interviniendo con el ADN.

El procedimiento de la presente invención se puede aplicar con muestras de individuos de cualquier sexo, es decir, hombre o mujer, y de cualquier edad.

- 5 En una realización particular, los individuos sometidos al procedimiento de la presente invención son individuos de grupos conocidos por su mayor predisposición al CRC, tales como sujetos varones y/o individuos de 50 años de edad o más, o preferiblemente de 60 años de edad o más. Puede también llevarse a cabo con individuos en cualquier etapa del CRC, aunque se prefiere
- 10 el CRC avanzado preferiblemente el CRC metastásico. Aún más preferido es la utilización del procedimiento de la presente invención para predecir el tratamiento con quimioterapia de un sujeto que padezca de CRC en la etapa IV.

- En el procedimiento de la presente invención, se puede normalizar la
- 15 expresión del miARN en relación con un control endógeno. El control endógeno es preferiblemente la expresión endógena (es decir, en el mismo individuo) de otro ácido nucleico, preferiblemente un ARN, tal como uno cualquiera seleccionado entre ARNm, miARN, ARN nucleolar, ARNr y similares. Se prefiere en gran manera que dicho ARN se sepa que se expresa de manera
- 20 estable. La expresión estable significa cualquier expresión que se sabe que se expresa de manera independiente de factores variables tales como la edad, el tipo de célula, la enfermedad, el sexo, el estado fisiológico, o la respuesta a condiciones externas, o similares. Los genes que se expresan de manera estable se conocen también como genes de mantenimiento. En una realización
- 25 particular, se puede escoger este ácido nucleico entre ARN nucleolares pequeños, preferiblemente MammU6. (MammU6 se usa, por ejemplo, para la normalización en el ensayo de microARN humano TaqMan Set v2.0 comercialmente disponible, que se ha usado en los ejemplos de la presente invención). Se pueden usar también para la normalización otros ARN
- 30 nucleolares tales como RNU44, RNU48, RNU24, RNU43, RNU6B, RNU19, y Z30, así como el miARN de genes (let-7a, miR-10b, miR-16, miR-21 and miR-

26b). RUN44 y RUN48 pueden ser particularmente útiles. Se puede acceder a todas las secuencias de los nucleótidos de los miARN en línea en la miRBase (miRBase 16), que es el principal depositario en línea de todas las secuencias y anotaciones de microARNs (Kozormara y *col.*, Nucl. Acids Res. (2011) 39
5 (suppl 1)). Las secuencias de nucleótidos de los otros ARN humanos, tales como los ARN nucleolares pequeños se pueden encontrar en línea en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (ensamblaje GRCh37 (GCA_000001405.6) procedente del Genome Reference Consortium). Se describen moléculas adicionales adecuadas para la normalización en Davoren y *col.*, BMC Mol Biol.
10 2008; 9: 76, y se pueden usar en el procedimiento de la invención. Es también posible que se use más de un ARN diferente para la normalización, tal como dos o más, tres o más y/o hasta cinco ARN diferentes. En cualquier caso, se obtiene el valor de referencia por normalización con respecto al mismo ácido nucleico que el valor del cual se va a predecir la respuesta del paciente.
15 Únicamente a fines de ilustración: si se obtiene el valor de referencia por normalización de la expresión de un(os) miARN concreto(s) de la invención con respecto a la expresión de MammU6, entonces, en el paciente del cual se va a predecir la respuesta, se obtiene también el valor de la expresión por normalización de la expresión de un(os) miARN concreto(s) de la invención con
20 respecto a la expresión de MammU6.

En el procedimiento de la invención, se pueden usar uno o más miARN como control negativo. Para los miARNs del control negativo, se prefiere principalmente un origen no humano.

Es también posible aislar los miARNs de la invención mediante cualquier
25 procedimiento conocido adecuado a dichos fines.

En un tercer aspecto, la invención proporciona también un procedimiento para clasificar un sujeto humano que padece cáncer colorrectal metastásico en uno de dos grupos. A no ser que se especifique de manera implícita o explícita de otra forma, los detalles de la invención tal como se ha detallado
30 anteriormente (incluyendo la normalización, el procedimiento de detección de las etapas del cáncer, etc.) se aplican también al tercer aspecto de la

invención. El grupo 1 comprende los sujetos identificables mediante el procedimiento de la invención tal como se ha detallado anteriormente que muestran una cualquiera o más de: respuesta, respuesta parcial, respuesta completa, supervivencia; y en el que el grupo 2 representa el resto de sujetos.

5 Es posible proporcionar una terapia personalizada a un individuo, dependiendo de si el individuo está clasificado en el grupo 1 o el grupo 2. Esto se lleva a cabo normalmente como sigue: (a) pacientes que experimentan cirugía para cáncer colorrectal, (b) a partir de cirugía, se extrae una muestra reciente de tumor para el análisis del miARN para la clasificación en el grupo 1 o el grupo
10 2. Basándose en la clasificación en el grupo 1 o el grupo 2, se puede seleccionar una terapia personalizada que puede ser particularmente beneficiosa para el paciente, cuyo tratamiento se proporciona además del tratamiento primario, principal o inicial, es decir, la cirugía. Dicho tratamiento adicional se puede denominar terapia auxiliar.

15 Los presentes inventores han identificado de esta manera un subgrupo novedoso de pacientes que se beneficiarían de la quimioterapia. De esta manera, la presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una fluoropirimidina y un agente adicional, seleccionado entre oxaliplatino e irinotecán, para tratar un sujeto humano del
20 grupo 1. Dada la predicción positiva, la invención proporciona de esta manera un procedimiento de selección de pacientes (grupo 1) que puede ser particularmente beneficioso para la administración de dicha terapia. Además, puede no justificarse en sujetos pacientes del grupo 1 la potencial toxicidad de un tratamiento alternativo, tal como un tratamiento basado en anticuerpos.

25 Además, la invención proporciona un anticuerpo terapéutico para tratar un sujeto humano del grupo 2. El anticuerpo se selecciona de manera preferible a partir de un anticuerpo dirigido contra VEGF y un anticuerpo dirigido contra EGFR. El anticuerpo es, preferiblemente, un anticuerpo monoclonal, humano o humanizado. Las terapias dirigidas basadas en
30 anticuerpos no son técnicamente quimioterapia. En particular, un anticuerpo útil dirigido contra VEGF puede ser bevacizumab, y el anticuerpo dirigido contra

EGFR se puede seleccionar entre cetuximab y panitumumab. Estos anticuerpos se sabe que son adecuados en casos de CRC, pero los criterios de acuerdo con el estado de la técnica por los cuales se seleccionan os pacientes para recibir tanto (1) quimioterapia como (2) terapia dirigida basada en anticuerpos son todavía pobres y a menudo insatisfactorios. A la vista de la contribución de la presente invención, y dada la predicción negativa para pacientes del grupo 2, puede no justificarse en sujetos pacientes del grupo 2 la potencial toxicidad y los efectos secundarios de un tratamiento de quimioterapia. Estos pacientes pueden a su vez someterse a un tratamiento con un anticuerpo terapéutico. Aunque no se requiera necesariamente, para definir un subgrupo de pacientes del grupo 2 que se va a someter a una terapia dirigida basada en anticuerpos, puede ser posiblemente recomendable de manera adicional determinar la expresión/estado de los genes para definir un subgrupo del grupo 2 que se va a tratar. Este subgrupo puede expresar niveles indicadores de un gen adicional y algunos anticuerpos terapéuticos vienen con recomendaciones específicas para ensayar los niveles de expresión de dicho gen adicional, ya sea por el fabricante y/o como se recomienda, por ejemplo, por la National Comprehensive Cancer Network (NCCN, www.nccn.org). Por ejemplo, se sabe que una determinación del estado del gen KRAS a partir tanto del tumor primario status como de un sitio de la metástasis debería ser parte de la elaboración de un pretratamiento con un anticuerpo dirigido contra EGFR para todos los pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal metastásico, basándose en los estudios de los resultados que indican que el estado del tumor producido por el gen KRAS es muy predictivo con respecto a los resultados con terapias dirigidas contra EGFR, es decir, los beneficios de la terapia inhibidora de EGFR se restringieron a pacientes con tumores caracterizados por el gen KRAS natural.

La presente invención proporciona también un kit que comprende al menos un(os) oligonucleótido(s) capaz(ces) de hibridarse con uno cualquiera de dos o más, y preferiblemente todos los miARNs que se definen como las SEQ ID NOs: 1 a 6. En la Tabla A3 se proporcionan las realizaciones

particulares de dichos oligonucleótidos.

El kit se basa en el poder predictivo del procedimiento de la presente invención. Tal como se ha mencionado anteriormente, el valor indicador de referencia para la falta de respuesta de cada miARN concreto se puede
5 determinar antes de llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. En el caso particular del kit, se pueden proporcionar con el kit el valor indicador de referencia para la falta de respuesta (y/o un valor de referencia indicador para la respuesta). Con la ayuda del kit, se puede calcular la expresión de cada miARN diana, es decir, con respecto a, dichas moléculas endógenas del control
10 ejemplificadas anteriormente. El control endógeno puede de esta manera estar comprendido también en el kit.

Se prefiere que dicho(s) oligonucleótido(s) tengan un contenido de GC entre 30 % y 70 %, preferiblemente entre 38 y 65 %. Esto se lleva a cabo también de tal manera que el(los) oligonucleótido(s) se hibride(n) con dos
15 correspondientes o menos, y preferiblemente sin correspondientes, con respecto al miARN que se va a determinar.

Siempre que se refiera a la hibridación del(de los) oligonucleótido(s), se prefiere que dicho(s) oligonucleótido(s) sea(n) capaz(ces) de hacerlo en condiciones rigurosas. El rigor es un término usado en los experimentos de
20 hibridación. El rigor refleja el grado de complementariedad entre el oligonucleótido y el ácido nucleico (que es en este caso el del miARN que se va a detectar), el de mayor rigor, el mayor porcentaje de homología entre la sonda y el ácido nucleico que se une al filtro. La persona experta sabe bien que la temperatura y las concentraciones salinas tienen un efecto directo en los
25 resultados que se obtienen. Se reconoce que los resultados de la hibridación están relacionados con el número de grados por debajo de la T_f (temperatura de fusión) del ADN a la cual el experimento se lleva a cabo. A menudo, se definen las condiciones de rigor como un lavado con 0,1X SSC (tampón de solución salina-citrato de sodio (SSC) a 65°C. (SSC se proporciona
30 normalmente como una disolución madre 20X, que consta de cloruro de sodio 3 M y citrato trisódico 300 mM (ajustado a pH 7,0 con HCl)).

En una realización preferida uno o más de dicho uno o más oligonucleótido(s) se definen además por las siguientes SEQ ID NOs: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12. Se proporcionan sus detalles en la Tabla A3.

5 **Tabla A3: Secuencias de oligonucleótidos**

Secuencia del oligonucleótido	SEQ ID NO	Para la hibridación con la SEQ ID NO:	pbs	% de GC, Tf
CAGCATTGTACAGGGCTATCA	7	1	21 pbs	GC = 47,63%, Tf = 57,7
GAACGGCTTCATACAGGAGTT	8	2	21 pbs	GC = 47,63%, Tf = 59,6
CACGGTGTCAGCAGGCA	9	3	17 pbs	GC = 64,72%, Tf = 60,8
CCCATGGTGCCTTCTCCT	10	4	18 pbs	GC = 61,12%, Tf = 62,0
GGTTAATATCGGACAACCATTGT	11	5	23 pbs	GC = 39,14%, Tf = 58,3
AAGCTCGCTTCTATGGGTCTG	12	6	21 pbs	GC = 52,39%, Tf = 61,5

En realizaciones particulares, el kit se selecciona entre (a) un kit adecuado para la PCR, (b) un kit adecuado para la Transferencia Northern Blot y (c) un kit adecuado para los análisis de micromatriz. Se pueden combinar

cualquiera de dos o más de estas realizaciones, de tal manera que el kit puede comprender, por ejemplo, ambos de (a) y (c).

En el caso de (a) un kit adecuado para la PCR, esta PCR es normalmente la PCR cuantitativa en tiempo real PCR (RQ-PCR), una técnica de cuantificación de la expresión génica sensible y reproducible. En este caso se desea que el kit comprenda adicionalmente un cebador del oligonucleótido poliT además del(de los) oligonucleótido(s) del kit. El cebador del oligonucleótido poliT se puede usar junto con el(los) oligonucleótido(s) de la invención para el cebado de la PCR, tras la poliadenilación de los miARN aislados mediante los procedimientos conocidos por la persona experta, tales como usando la polimerasa poli(A) y ATP. Estos reactivos pueden estar comprendidos opcionalmente en el kit.

Una Transferencia Northern implica el uso de electroforesis para separar las muestras de ARN por tamaño y la posterior detección con un(os) oligonucleótido(s) (sonda de hibridación) complementaria con (parte de) la secuencia diana del ARN de interés.

Es también posible que el(los) oligonucleótido(s) estén inmovilizados en manchas sobre una superficie (preferiblemente sólida). En una de sus realizaciones, el kit comprende una micromatriz. Una micromatriz de ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (normalmente un porta de vidrio o una celda de una película fina de silicio) que evalúa grandes cantidades de diferentes ARN (aquí miARN) que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre manchas sobre un sustrato sólido. Cada mancha contiene una secuencia específica de ácido nucleico, normalmente una secuencia de ADN, como sondas (o indicadores). Aunque el número de manchas no está limitado de manera alguna, existe una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los procedimientos de la invención. En una realización, dicha matriz personalizada comprende cincuenta manchas o menos, tal como treinta manchas o menos, incluyendo veinte manchas o menos. En una realización particular, dicha micromatriz personalizada comprende los oligonucleótidos tal como se han definido en las

SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, 11 y 12 o los oligonucleótidos que comprenden estas secuencias. En una realización particular, el Ensayo de microARN humano TaqMan Set v2.0 se puede excluir de la invención.

El uso del kit no está particularmente limitado, aunque se prefiere su uso en el procedimiento de la invención o en cualquiera de sus realizaciones.

Materiales y Métodos

Pacientes y especímenes clínicos

El presente estudio se ha llevado a cabo en 61 pacientes que se habían sometido a cirugía para el cáncer colorrectal. Se utilizaron treinta y nueve pacientes en el estudio del perfil de expresión del miARN y 22 para los resultados de la prueba. Se alistaron los pacientes en el Hospital Universitario Virgen del Rocío, el Hospital Universitario Virgen de la Victoria, El Hospital de La Merced, y el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Sevilla, España. El promedio de seguimiento fue de 28 meses [16.0-43.2] y a los 30 meses [19.0-44.5] los pacientes murieron. Los rasgos clínicos de los pacientes se resumen en la Tabla 1. Se trató a todos los pacientes con quimioterapia basada en fluoropirimidina más oxaliplatino o irinotecán (véanse los detalles a continuación) hasta la progresión de la enfermedad. Se obtuvo un formulario con el consentimiento por escrito de todos los pacientes y los Comités Éticos de los Hospitales aprobaron el estudio. Durante el procedimiento quirúrgico se extrajeron muestras de tejido tumoral de todos los pacientes y a continuación se congelaron instantáneamente de manera inmediata a -80°C hasta su uso.

Quimioterapia

Los pacientes de quimioterapia se sometieron a ésta en todos los casos con terapia basada en fluoropirimidina. Hubo sin embargo dos diferentes grupos de pacientes, llevándose a cabo el agrupamiento en un segundo agente comprendido en la terapia (tratamiento combinado). En cualquier caso, el segundo agente fue un agente que se entendía que intervenía en el ADN. Por tanto, existen dos grupos de pacientes:

30 Grupo 1. Quimioterapia basada en oxaliplatino y fluoropirimidina.

mFOLFOX 6 (43,6% de pacientes): 85 mg/m² de Oxaliplatino IV, día 1.

400 mg/m² de Leucovorina IV, día 1. 400 mg/m² de 5-FU bolo IV en el día 1, a continuación 1200 mg/m²/día x 2 días (total 2400 mg/m² durante 46-48 horas) en infusión continua. Repetir cada 2 semanas.

- CapeOx (38,5% de pacientes): 130 mg/m² de Oxaliplatino, día 1.
5 1000 mg/m² de Capecitabina dos veces al día los días 1-14 cada 3 semanas x 24 semanas.

TOMOX (2,5% de pacientes): 3 mg/m² de Raltitrexed bolo IV, día 1. 130 mg/m² de Oxaliplatino bolo IV, día 1. Repetir cada 3 semanas.

10 Grupo 2. Quimioterapia basada en irinotecán y fluoropirimidina.

FOLFIRI (12,8% de pacientes): 180 mg/m² de Irinotecán IV, día 1. 400 mg/m² de Leucovorina infusión IV, día 1. 400 mg/m² de 5-FU bolo IV día 1, a continuación 1200 mg/m²/día x 2 días (total 2400 mg/m² durante 46-48 horas) en infusión continua. Repetir cada 2 semanas.

- 15 CPT-11+TOMUDEX (2,5 % de pacientes): 3 mg/m² de Raltitrexed bolo IV, día 1. 300 mg/m² de Irinotecán IV, día 1. Repetir cada 3 semanas.

Los inventores no observaron diferencias significativas en el comportamiento de ambos grupos de acuerdo con la respuesta y el perfil. Ambos grupos pueden considerarse por tanto como un grupo tratado, que es
20 un grupo de pacientes de CRC a los cuales se administraron fluoropirimidina y el agente adicional.

Ensayo qRT-PCR de aislamiento de ARN y miARN

Se extrajo el ARN total, que contenía ARN pequeño, de una muestra de tejido tumoral mediante el kit mirVana de aislamiento de miARN (Ambion, 25 Austin, TX, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó el rendimiento del ARN total usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Tech, DE, USA). Se detectó la expresión del miARN humano maduro y se cuantificó usando las matrices de baja densidad TaqMan[®] (TLDA) basadas en las Micro Fluidic Cards 7900 HT de Applied Biosystems (Applied
30 Biosystems, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La matriz Human MicroRNA Card Set v2.0 es un conjunto de dos tarjetas que

contienen un total de 384 ensayos TaqMan[®] de MicroRNA por tarjeta que permiten una cuantificación fiable de 667 microARN humanos, todos ellos catalogados en la base de datos miRBase. Se llevaron a cabo las TLDA en un procedimiento en dos etapas: de manera breve, durante la primera etapa, se transcribieron de manera inversa 450 ng de ARN total usando Cebadores Megaplex RT y el kit de transcripción inversa del miARN de TaqMan en un volumen total de 7,5 µl. Los 7,5 µl de las reacciones se incubaron en un ciclador térmico G-Storm (Gene Technologies, Essex, Reino Unido) durante 2 min a 16 °C, 1 min a 42 °C, y 1 min a 50 °C durante 40 ciclos, se mantuvieron durante 5 min a 85°C, y a continuación se mantuvieron a 4 °C. En la segunda etapa, 6 µl de una muestra de ADNc y una mezcla maestra TaqMan Universal PCR se introdujeron en los puertos de relleno de la tarjeta de TLDA microfluídico. La tarjeta se centrifugó de manera breve durante 1 min a 280 g para distribuir las muestras en los múltiples pocillos conectados a los puertos de relleno y a continuación se sellaron para evitar la contaminación entre pocillos. Se incubaron las reacciones en una placa de 384 pocillos a 50 °C durante 2 s y 94,5 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 30 s a 97 °C y 1 min a 59 °C. Se evaluaron las validaciones de los miARN usando los ensayos de MicroARN TaqMan[®] (Applied Biosystems, CA, EE. UU.). Tras la poliadenilación, se usó un cebador poliT para sintetizar el ADNc la población agrupada de miARN, y se purificó y concentró la primera cadena de ADNc resultante. Posteriormente, se analizó la primera cadena de ADNc mediante la qPCR usando SYBR[®] Green, el cebador poliT y un cebador directo diseñado a partir de las dianas de la secuencia del miARN específico de interés (miR-107, miR-337-5p, miR-564, miR-605, miR-889 y miR-99a*). Estos cebadores directos son los oligonucleótidos que se definen en las SEQ ID NOs: 7 a 12. Diez ng del ARN total se transcribieron de manera inversa usando el kit TaqMan de transcripción inversa del miARN en un volumen total de 10 µl. Se incubaron las reacciones durante 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C, y 5 min a 85 °C, y a continuación se mantuvieron a 4 °C. Después, se usaron 1,33 µl de ADNc para los ensayos de MicroARN TaqMan. Las reacciones se incubaron a

95 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Se calculó la expresión de cada miARN diana con respecto al control endógeno MammU6. Se presentan los datos como expresión del miARN diana = $2^{\Delta Ct}$, con $\Delta Ct = (Ct \text{ de U6B} - Ct \text{ del miARN diana})$.

5 Análisis de la expresión del miARN

La expresión del miARN se normalizó en relación con la expresión de MammU6. Se usó en cada experimento un miARN no humano como control negativo. Finalmente, se procesaron y analizaron las tarjetas en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 HT. Se calcularon los valores
10 umbrales de ciclo (Ct) usando el software SDS v.2.3 usando las configuraciones automáticas de los valores iniciales y un umbral de 0,2.

Los inventores clasificaron a los pacientes en dos grupos de acuerdo a la quimioterapia, es decir, se definió la respuesta (R) como $\geq 30\%$ de disminución en la carga total del tumor (definida como la suma de las áreas del
15 tumor de las lesiones medidas bidimensionalmente, se llevó a cabo la tomografía computerizada de acuerdo con las directrices de RECIST), tomando como referencia los valores correspondientes a los valores iniciales, sin la aparición de una nueva lesión. Se definió la falta de respuesta (NR) como $< 30\%$ de disminución o $> 20\%$ de aumento en el área del tumor de una o más
20 lesiones medibles o, la aparición de al menos una nueva lesión.

Se calculó la cuantificación relativa de la expresión del miARN mediante el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es una forma conveniente de analizar los cambios relativos en la expresión génica a partir de los experimentos de la PCR cuantitativa en tiempo real. (Boletín de usuario de
25 Applied Biosystems no 2 (P/N 4303859)). Se calculó la expresión de los microARN usando el software Real-Time Statminer[®] v.4.2 (Intergromics, Inc). Este software lleva a cabo un test de la t moderado entre los grupos (R y NR) los corrige usando el algoritmo de Benjamini-Hochberg (Benjamini Y, y col 1995) con la Proporción de Descubrimientos Falsos (FDR) ajustada a un valor
30 del 5%. A los efectos de este estudio, se consideró significativa la expresión del miARN cuando el miARN se había detectado al menos en un 50% de pacientes

en cada grupo comparado. Además, en las situaciones en la que no se detecta el miARN y los valores de Ct se encuentran más allá del máximo en Ct 36, el software StatMiner imputa un valor, que se ajusta al Ct máximo.

Se llevó a cabo el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier sobre la supervivencia exenta de progresión (PFS) y la supervivencia total (OS) de los pacientes como una función de la expresión del miARN, usando el valor promedio como el de interrupción. Se calculó la PFS como el tiempo entre la fecha del diagnóstico y la fecha de la progresión clínica. Se calculó la OS a partir de la fecha del diagnóstico hasta la fecha de la muerte (debida a cualquier causa) y se silenciaron los datos de los pacientes que sobrevivieron, de los que lo último que se sabía es que permanecían con vida. Se usó la prueba del rango logarítmico para ensayar las diferencias de supervivencia entre grupos. Se usaron los modelos multivariantes de regresión de Cox de la PFS y la OS para proporcionar comparaciones ajustadas del tratamiento e identificar factores simultáneos de pronóstico significativo. Se usó el test de Kruskal-Wallis para la comparación de los promedios y, para casos en los que dio como resultado una significativa diferencia ($p < 0,05$), se aplicó el test de Mann-Whitney para la comparación entre grupos. Estos análisis se llevaron a cabo usando el software SPSS (Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales versión 17.0; SPSS, Inc, Chicago, IL).

Análisis univariante y multivariante

Se llevó a cabo el análisis univariante para explorar cada variable en un conjunto de datos, por separado. Esto describe el modelo de respuesta de la variable. Se llevaron a cabo comparaciones univariantes entre grupos usando test de la t de muestras independientes. Los valores p resultantes se ajustaron para un ensayo múltiple mediante el ajuste de Benjamini-Hochberg.

Los miARN con $p < 0,05$ en el análisis univariante fueron habilitados para el análisis multivariante de regresión de Cox. (Se llevó a cabo de manera general el análisis multivariante de más de una variable estadística en el tiempo). Se llevó a cabo el análisis de regresión de Cox para probar la asociación de los miARN con el tiempo de supervivencia (PFS y OS). Se

incluyeron los microARN con asociación significativa con PFS y/u OS en ambos análisis univariantes en el modelo de regresión de Cox. Se llevaron a cabo estos análisis usando el software SPSS (Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales versión 17.0; SPSS, Inc, Chicago, IL).

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Identificación de los modelos de expresión del miARN en pacientes de acuerdo con las respuestas a la quimioterapia. Valor pronóstico de supervivencia de acuerdo con los perfiles de expresión del microARN.

10 Se evaluó el perfil de expresión del microARN en pacientes con cáncer colorrectal avanzado usando los análisis de la qRT-PCR. La expresión comparativa relativa al miARN (niveles de respuesta frente a falta de respuesta a la quimioterapia (para los detalles de la quimioterapia véase la sección de "Materiales y Métodos")) se representó como gráfico volcán en la Figura 1. (En estadística, un gráfico volcán es un tipo de diagrama de puntos que se usa para identificar con rapidez cambios en grandes conjuntos de datos compuestos de datos replicados. La primera dimensión (horizontal) es el cambio de veces entre los dos grupos (en una escala logarítmica, de tal manera que la regulación en exceso y en defecto parece simétrica), y el segundo eje (vertical) representa el valor p de un test de la t de diferencias entre las muestras (lo más conveniente en una escala logarítmica negativa — de esta manera, los valores p más pequeños parecen mucho mayores—). El primer eje indica el impacto biológico del cambio y el segundo indica la evidencia estadística, o la fiabilidad del cambio). Aquí, cerca del 7% (N=46) de los 667 miARN estudiados mostraron diferencias de expresión ($p < 0,05$).

Ejemplo 1A: Diferencias de expresión significativas

Entre los miARN detectados con diferencias de expresión significativas (Ejemplo 1), solo se detectaron ocho miARN (let-7g*, miR-107, miR-299-5p, miR-337-5p, miR-370, miR-505*, miR-889, miR-99a*) al menos en un 50% de pacientes de ambos grupos comparados (R y NR) (Tabla 2). Se consideró que este valor era representativo del comportamiento general de la población del

estudio. Concretamente, en el caso de miR-107, miR-337-5p, miR-564, miR-605, miR-889 and miR-99a*, se detectó la expresión en un 92,8% de los pacientes estudiados.

Tabla 2. Los miARN expresaron de manera diferente la respuesta a la quimioterapia en pacientes con CRC metastásico, de acuerdo con el análisis de la RT-PCR en tiempo real.

MicroARN	SEQ ID NO	R vs NR ($-\Delta\Delta Ct$)	Valores p-ajustados*
let-7g*		0,863	0,042
miR-107	1	0,706	0,042
miR-299-5p		0,864	0,006
miR-337-5p	2	0,952	0,018
miR-370		1,162	< 0,001
miR-505*		0,877	0,006
miR-889	5	-0,560	0,042
miR-99a*	6	0,715	0,016

Los pacientes en tratamientos clínicos se clasificaron en dos grupos, es decir, respuesta (R) o sin respuesta (NR) a la quimioterapia sobre la base de cambio en el tamaño de la lesión.

- 10 *Los valores p resultantes se ajustaron al ensayo múltiple en el ajuste de Benjamini-Hochberg.

Ejemplo 1B: Correlación

Basándose en los datos de expresión significativa de miARNs, se determinó la correlación de los resultados significativos de expresión del miARN con PFS y OS para identificar el valor pronóstico de la expresión específica del miARN en pacientes con cáncer colorrectal avanzado. El PFS promedio fue de 13,6 meses [8,8-21,2] y el OS promedio fue de 25,6 meses [17,1-39,3]. En la figura 2A y la figura 2B se muestran las estimaciones de Kaplan-Meier del PFS y el OS de ocho miARN con diferencias de expresión significativas en pacientes con R y NR. Entre los 8 miARN, la expresión de

15

20

miR-107, miR-337-5p and miR-99a* se asoció con PFS y OS ($p < 0,05$). Además, miR-889 se asoció con OS ($p=0,017$). Todos los otros miARN no se asociaron con PFS u OS.

Ejemplo 2: Modelos de expresión de los MicroARN de acuerdo con la quimioterapia, es decir, respuesta completa, respuesta parcial, y enfermedad estable frente a enfermedad progresiva.

Para evaluar las diferencias en la expresión del miARN sobre la base del cambio biológico del tumor con la quimioterapia, los inventores compararon pacientes con enfermedad progresiva (PD) frente a pacientes con respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), y enfermedad estable (SD). Se han recogido muestras de tejido tumoral durante el procedimiento quirúrgico (antes del inicio de la quimioterapia).

Estas respuestas se definieron usando las directrices de RECIST (versión 1.1) (Eisenhauer y col. 2009). En este análisis, los inventores detectaron varios miARN con expresión significativa en las diferentes respuestas a la quimioterapia. Los inventores de la presente invención detectaron 7 miARN expresados de forma diferente en la SD (miR-301b, miR-338-3p, miR-564, miR-625*, miR-760, miR-885-5p, y miR-941), 5 miARN en la PR (miR-107, miR-337-5p, miR-450b-5p, miR-539, y miR-589*) y 3 miARN (miR-509-3p, miR-571, y miR-605) en la CR. Además, miR-597 se expresó de manera significativamente diferencial en las tres respuestas al tratamiento frente a la enfermedad progresiva (Tabla 3).

Tabla 3. Los miARNs expresaron de manera diferente la respuesta a la quimioterapia en pacientes con carcinoma colorrectal, de acuerdo con el análisis de la RT-PCR en tiempo real.

Micro ARN	SEQ ID NO	SD vs PD (- $\Delta\Delta$ Ct)	Valores p ajustados	PR vs PD (- $\Delta\Delta$ Ct)	Valores p ajustados*	CR vs PD (- $\Delta\Delta$ Ct)	Valores p ajustados
miR-107	1	0,702	0,325	1,298	0,031	1,234	0,143
miR-301b		1,302	0,024	0,335	0,671	0,140	0,955
miR-337-5p	2	1,046	0,231	1,916	0,001	1,876	0,058
miR-338-3p		1,449	<0,001	0,354	0,645	0,364	0,825
miR-450b-5p		0,649	0,396	1,388	0,006	-1,165	0,108
miR-509-3p		-1,373	0,069	-1,172	0,244	-2,474	0,001
miR-539		1,227	0,099	1,858	0,031	0,982	0,569
miR-564	3	-1,473	<0,001	-0,123	0,889	-0,226	0,867
miR-571		-1,007	0,098	-0,494	0,500	-1,901	0,028
miR-589*		0,574	0,433	1,578	0,002	-0,522	0,760
miR-597		-1,743	<0,001	-1,233	0,007	-1,578	0,039
miR-605	4	-0,699	0,440	-0,445	0,575	-2,190	0,015
miR-		-1,050	0,037	-0,792	0,267	-1,556	0,108

625*							
miR-760		-2,255	0,002	-1,261	0,181	-	-
miR-885-5p		-1,262	0,009	-0,076	0,969	-	-
miR-941		-0,962	0,031	-0,295	0,611	-1,200	0,247

Los pacientes en tratamientos clínicos se clasificaron en uno de cuatro grupos, es decir, respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), enfermedad estable (SD) y enfermedad progresiva (PD) en base al cambio en el tamaño de la lesión.

- 5 *Los valores p resultantes se ajustaron para el múltiple ensayo mediante el ajuste de Benjamini-Hochberg.

Se detectaron todos los miARN al menos en un 50% de pacientes de los grupos comparados. Se estimó la Kaplan-Meier de la PFS y la OS de dieciséis miARN diferenciados. Se asociaron el MicroARN-107, miR-337-5p y miR-605 con la PFS y la OS, y se asoció también miR-564 con la OS (Figura 3A y 3B). Los inventores de la presente invención compararon el valor promedio de la expresión de miR-107, miR-337-5p, miR-605 y miR-564 entre la CR, PR, o SD frente a la PD. El valor Δ Ct promedio comparativo relativo de miR-107, miR-337-5p, miR-605 y miR-564 en cada grupo (CR, PR, SD y PD) se representa en la Figura 4.

Las expresiones del microARN-107 y miR-337-5p fueron inferiores en los pacientes con CR y PR en comparación con la SD y PD. (En el caso de miR-107 y miR-337-5p, los valores Δ Ct promedio fueron inferiores en pacientes con CR y PR en comparación con SD y PPD. De esta manera, los niveles de expresión de miR-107 y miR-337-5p fueron mayores en pacientes con CR y PR que en pacientes con SD y PD.)

En ambos los, miARN fueron significativamente menores en pacientes con PR frente a PD. No se encontró distribución homogénea en los niveles de

expresión de miR-564 en cuatro grupos de pacientes clasificados de acuerdo con la respuesta a la quimioterapia. Por otra parte, los niveles de expresión de miR-605 fueron significativamente menores en pacientes con PD frente a aquellos pacientes con una CR (Figura 4).

5 Ejemplo 3: Análisis multivariante de los resultados

Los resultados obtenidos de los pacientes con CRC avanzado clasificados como R y NR (Ejemplo 1) se compararon con los obtenidos en la CR, PR, SD y PD. De forma sorprendente, algunos resultados permanecieron muy similares en ambos análisis. Los inventores detectaron que el miRNA-107 y el miR-337-5p se expresaron de manera significativamente diferente tanto en el PFS como en OS en ambos análisis (Figura 5). Los inventores establecieron la supervivencia multivariante de PFS y OS incluyendo los miARN con análisis univariantes significativamente diferentes. Este modelo desveló que miR-107, miR-337-5p y miR-605 fueron significativos predictores del PFS y el miR-564 y miR-605 de OS. Este análisis desveló que la expresión de miR-107 y miR-337-5p fueron ~ mayores asociadas como factor de pronóstico del PFS ($p=0.026$; riesgo relativo (RR) 2.29 (95% de CI 1,10-4,79) y $p=0.022$; (RR) 2,53 (95% de CI 1,14-5,60), respectivamente) y miR-564 fue cinco veces mayor asociada como factor de pronóstico del OS ($p=0,009$; RR 5,11 (95% de CI 1,49-17,46). De esta manera, el análisis multivariante de regresión de Cox desveló que el miARN-107, miR-337-5p y miR-605 fueron factores predictores de la supervivencia, excepto la expresión de miR-99a* para PFS y la expresión de miR-564 y miR-605 para OS (Tabla 4).

25 **Tabla 4. Análisis univariante y multivariante de factores de pronóstico en pacientes de cáncer colorrectal para PFS y OS.**

miARN	SEQ ID NO	Análisis Univariante <i>Valor p</i>	Análisis multivariante	
			Riesgo Relativo (95% de CI)	<i>Valor p</i>
miR-107	1	0,043	2,29 [1,10-4,79]	0,026

PFS	miR-337-5p	2	0,018	2,53 [1,14-5,60]	0,022
	miR-605	4	0,014	0,35 [0,15-0,77]	0,009
	miR-99a*	6	0,030	1,54 [0,68-3,50]	0,297
OS	miR-107	1	0,035	2,64 [0,88-7,90]	0,082
	miR-337-5p	2	0,041	2,03 [0,48-8,49]	0,331
	miR564	3	0,025	5,11 [1,49-17,46]	0,009
	miR-605	4	0,005	0,17 [0,05-0,64]	0,009
	miR-889	5	0,017	0,48 [0,16-1,46]	0,198
	miR99a*	6	0,008	1,14 [0,29-4,49]	0,849

CI: Intervalo de confianza.

Ejemplo 4: Como se determinan los valores Δ Ct promedio

Los valores Δ Ct promedio de diversos grupos de sujetos se calcularon con respecto al control endógeno MammU6, tal como se indica a continuación.

- 5 De esta manera, MammU6 es un ejemplo de un ARN la expresión del cual puede servir para la normalización de la expresión relativa de los miARN de interés.

Ejemplo 4A: Valor Δ Ct determinado para los sujetos sin respuesta

- 10 Se evaluó el perfil de expresión del micro ARN usando los análisis de la qRT-PCR tal como se describe en el capítulo del procedimiento "Ensayo de la qRT-PCR para el aislamiento de ARN y miARN" anterior. Se calculó la expresión de cada miARN diana con respecto al control endógeno MammU6. Δ Ct = (Ct de U6B – Ct de miARN diana). Se encontró que un valor indicador del control adecuado de la falta de respuesta es el valor Δ Ct promedio de
- 15 sujetos sin respuesta (definiéndose la falta de respuesta como < 30% disminución en el área del tumor de una o más lesiones medibles o la aparición de al menos una nueva lesión). El valor Δ Ct promedio de la falta de respuesta se identificó como se muestra en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5: Valor Δ Ct promedio de la falta de respuesta

SEQ ID NO:	MicroARN	Valor Δ Ct promedio de la falta de respuesta
1	miR-107	13,40
2	miR-337-5p	12,84
5	miR-889	13,20
6	miR-99a*	12,81

Ejemplo 4B valores promedio del miARN de todos los sujetos:

Se evaluó el perfil de expresión del microARN de las muestras de todos los sujetos del estudio usando los análisis de la qRT-PCR tal como se describe en el capítulo del procedimiento "Ensayo de la qRT-PCR para el aislamiento de ARN y miARN" anterior. Se calculó la expresión de cada miARN con respecto al control endógeno MammU6. Δ Ct = (Ct de U6B – Ct del miARN diana). Se encontró que los valores promedio eran tal como se muestra en la siguiente Tabla 6.

10 Tabla 6: valores promedio de los miARN

SEQ ID NO:	MicroARN	Δ Ct (promedio)
1	miR-107	13,1575
2	miR-337-5p	12,4475
3	miR-564	13,3325
4	miR-605	11,415
5	miR-889	13,3375
6	miR-99a*	12,3825

Ejemplo 4 C: Valor Δ Ct promedio determinado para la enfermedad progresiva y la respuesta parcial de los sujetos

Se evaluó el perfil de expresión del microARN usando los análisis de la qRT-PCR tal como se describe en el capítulo del procedimiento “Ensayo de la qRT-PCR para el aislamiento de ARN y miARN anterior. Se calculó la expresión de cada miARN con respecto al control endógeno MammU6. Δ Ct = (Ct de U6B – Ct del miARN diana). Se agruparon los sujetos de acuerdo con las directrices RECIST, y se calcularon los valores Δ Ct promedio de la enfermedad progresiva y la respuesta parcial, respectivamente. Se identificaron los valores Δ Ct promedio de la enfermedad progresiva/respuesta parcial tal como se muestra en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7: Valor Δ Ct promedio de la enfermedad progresiva y la respuesta parcial

SEQ ID NO:	MicroARN	Valor Δ Ct promedio de la enfermedad progresiva	Valor Δ Ct promedio de la respuesta parcial
1	miR-107	13,92	12,62
2	miR-337-5p	13,74	11,82
4	miR-605	10,78	11,23

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir la respuesta de un sujeto humano a la quimioterapia, en el que el sujeto padece cáncer colorrectal avanzado, y en el que el procedimiento comprende:

usar, como indicador, la determinación de los niveles de expresión de uno o más de los siguientes miARNs:

- i) SEQ ID NO: 1 (miR107);
- ii) SEQ ID NO: 2 (miR337-5p);
- iii) SEQ ID NO: 3 (miR564);
- iv) SEQ ID NO: 4 (miR605);
- v) SEQ ID NO: 5 (miR889);
- vi) SEQ ID NO: 6 (miR99a*);

donde se obtiene el resultado del procedimiento comparando los niveles de expresión de dichos uno o más miARNs con niveles control de expresión indicativos de falta de respuesta.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer colorrectal avanzado es cáncer colorrectal metastásico (MCRC).

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la respuesta se refiere a las características del tumor del sujeto.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la respuesta es $\geq 30\%$ de disminución en la carga total del tumor, y en el que se usa como un indicador, los niveles de expresión de uno o más miARNs tal como se han definido en las SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6, y en el que el resultado es indicador de la respuesta si:

(i) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 1 han aumentado; y/o

(ii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 2

han aumentado; y/o

(v) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 5 han disminuido; y/o

5 (vi) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 6 han aumentado.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la respuesta es parcial o completa, y en el que, como un indicador, se usan los niveles de expresión de uno o más miARN tal como se han definido en las SEQ ID NOs: 1, 2, 4, y en el que el resultado es indicador de la respuesta si:

(i) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 1 han aumentado; y/o

(ii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 2 han aumentado; y/o

15 (iv) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 4 han disminuido.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la respuesta se refiere al resultado clínico del sujeto.

20

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el resultado clínico es la supervivencia exenta de progresión y en el que el resultado es indicador de supervivencia exenta de progresión si

25 (i) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 1 han aumentado; y/o

(ii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 2 han aumentado; y/o

(iv) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 4 han disminuido; y/o

30 (vi) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 6 han aumentado.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el resultado clínico es la supervivencia total y en el que el resultado es indicador de la supervivencia total si
- 5 (i) Los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 1 han aumentado; y/o
- (ii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 2 han aumentado; y/o
- (iii) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 3
- 10 han aumentado; y/o
- (iv) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 4 han disminuido; y/o
- (v) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 5 han disminuido; y/o
- 15 (vi) los niveles del miARN tal como se ha definido en la SEQ ID NO: 6 han aumentado.
9. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho resultado se puede obtener mediante
- 20 (i) un procedimiento de perfilado génico, tal como una micromatriz; y/o
- (ii) un procedimiento que comprende la PCR, tal como la PCR en tiempo real; y/o
- (iii) transferencia Northern.
- 25 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el resultado se puede obtener mediante la PCR cuantitativa en tiempo real y se expresa como $-\Delta\Delta Ct$.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento se lleva a cabo *in vitro* usando una
- 30 muestra originaria del sujeto humano, y en el que en el momento de tomar la muestra del sujeto humano, el sujeto humano no está siendo tratado con

quimioterapia.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la quimioterapia comprende la administración de fluoropirimidina.

5

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la quimioterapia es una terapia de combinación que comprende la administración de fluoropirimidina y de un agente adicional.

10 14. El procedimiento de una cualquiera o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la expresión del miARN está normalizada, preferiblemente en relación con la expresión de MammU6.

15 15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que se selecciona la quimioterapia a partir de una terapia que comprende la administración de:

- a. oxaliplatino y fluoropirimidina, o
- b. irinotecán y fluoropirimidina.

20 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente ha experimentado la resección quirúrgica del cáncer antes de la aplicación del procedimiento.

25 17. Un procedimiento para clasificar un sujeto humano que padece de cáncer colorrectal metastásico en uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende los sujetos identificables mediante el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5 o 7 u 8 o cualquiera de las reivindicaciones dependientes de la anteriores,

y en el que el grupo 2 representa el resto de sujetos.

30

18. Una composición farmacéutica que comprende una fluoropirimidina y un

agente adicional seleccionado entre oxaliplatino e irinotecán, para tratar un sujeto humano del grupo 1 identificable mediante el procedimiento de la reivindicación 17.

5 19. Un anticuerpo para tratar un sujeto humano del grupo 2 identificable
mediante el procedimiento de la reivindicación 17, en el que el anticuerpo se
selecciona a partir de un anticuerpo dirigido contra VEGF y un anticuerpo
dirigido contra EGFR, en el que el anticuerpo dirigido contra VEGF es
preferiblemente bevacizumab, y el anticuerpo dirigido contra EGFR se
10 selecciona preferiblemente entre cetuximab y panitumumab.

20. Un kit que comprende al menos un(os) oligonucleótido(s) capaz(ces) de
hibridarse con uno cualquiera de dos o más, y preferiblemente todos los miARN
tal como se ha definido en las SEQ ID NOs: 1 a 6 en condiciones de rigor.

15

21. El kit de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el dicho uno o más
oligonucleótido(s) se definen además mediante las siguientes SEQ ID NOs:
SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11,
SEQ ID NO: 12.

20

22. Un kit de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende
adicionalmente un cebador del oligonucleótido poliT.

23. Un kit de acuerdo con las reivindicaciones 20 o 21, en el que el(los)
25 oligonucleótido(s) están inmovilizados en manchas sobre una superficie, que es
preferiblemente la superficie de una micromatriz.

24. Uso del kit de acuerdo con la reivindicación 20 en un procedimiento de
acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

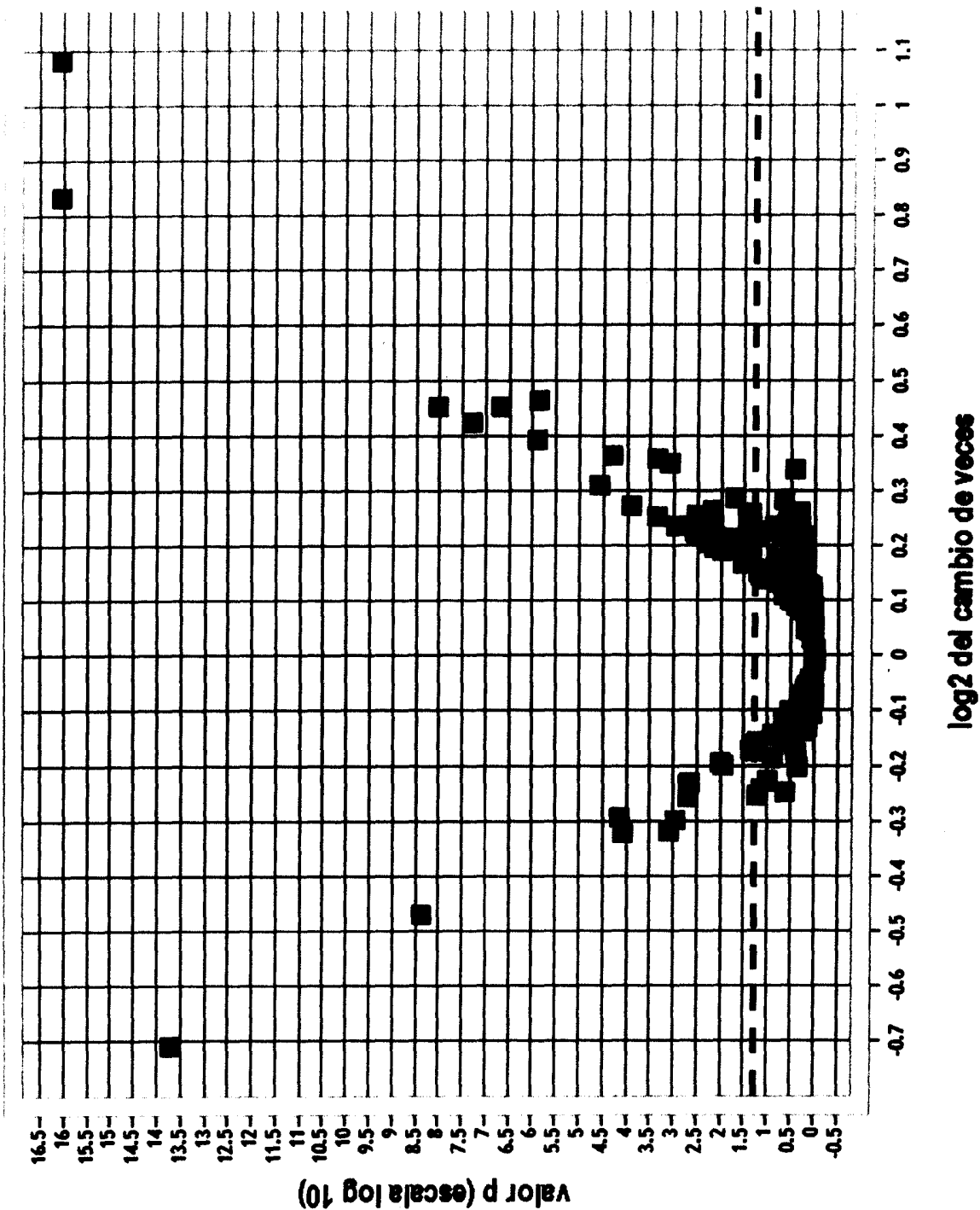


Figura 1

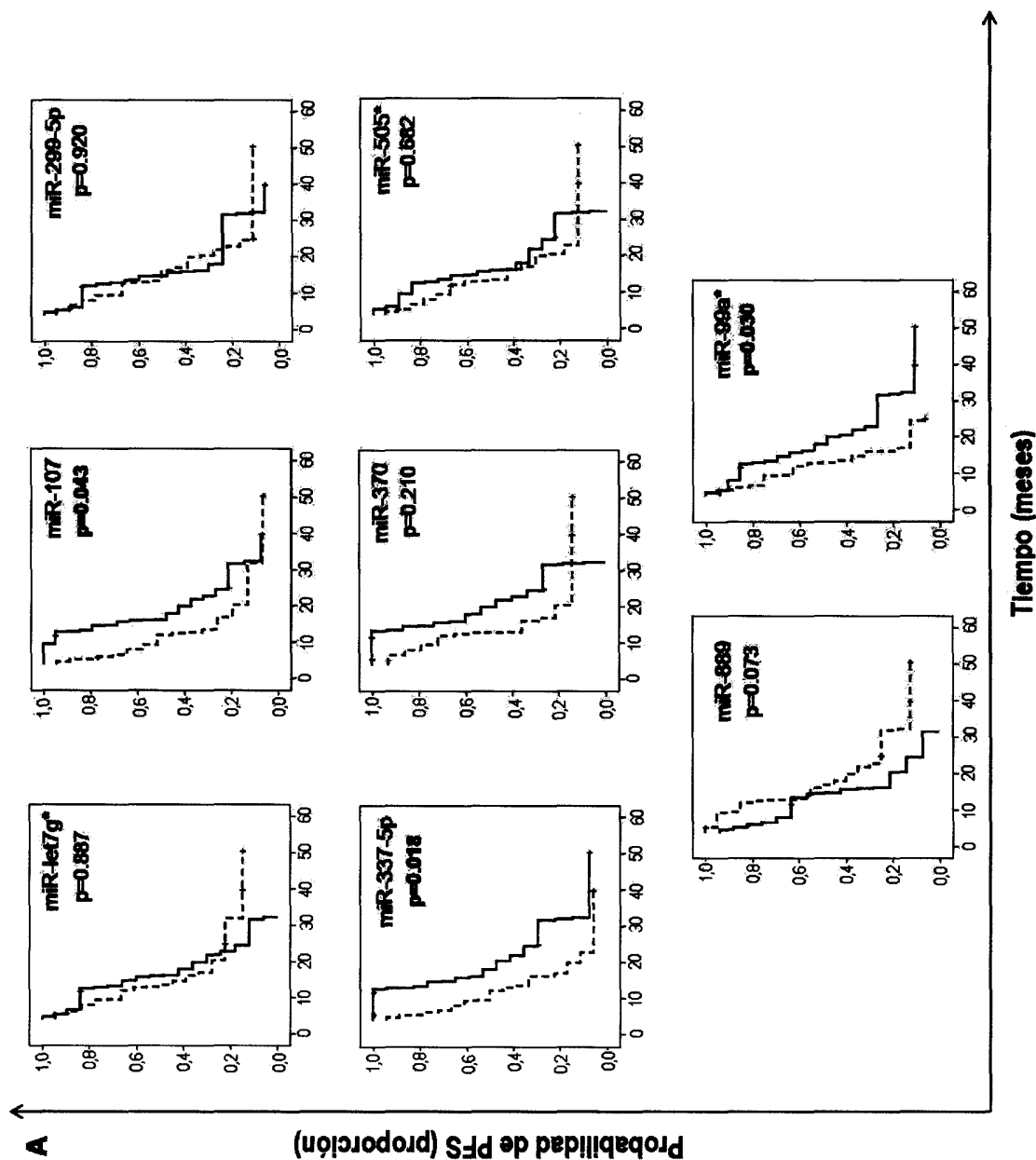


Figura 2 A

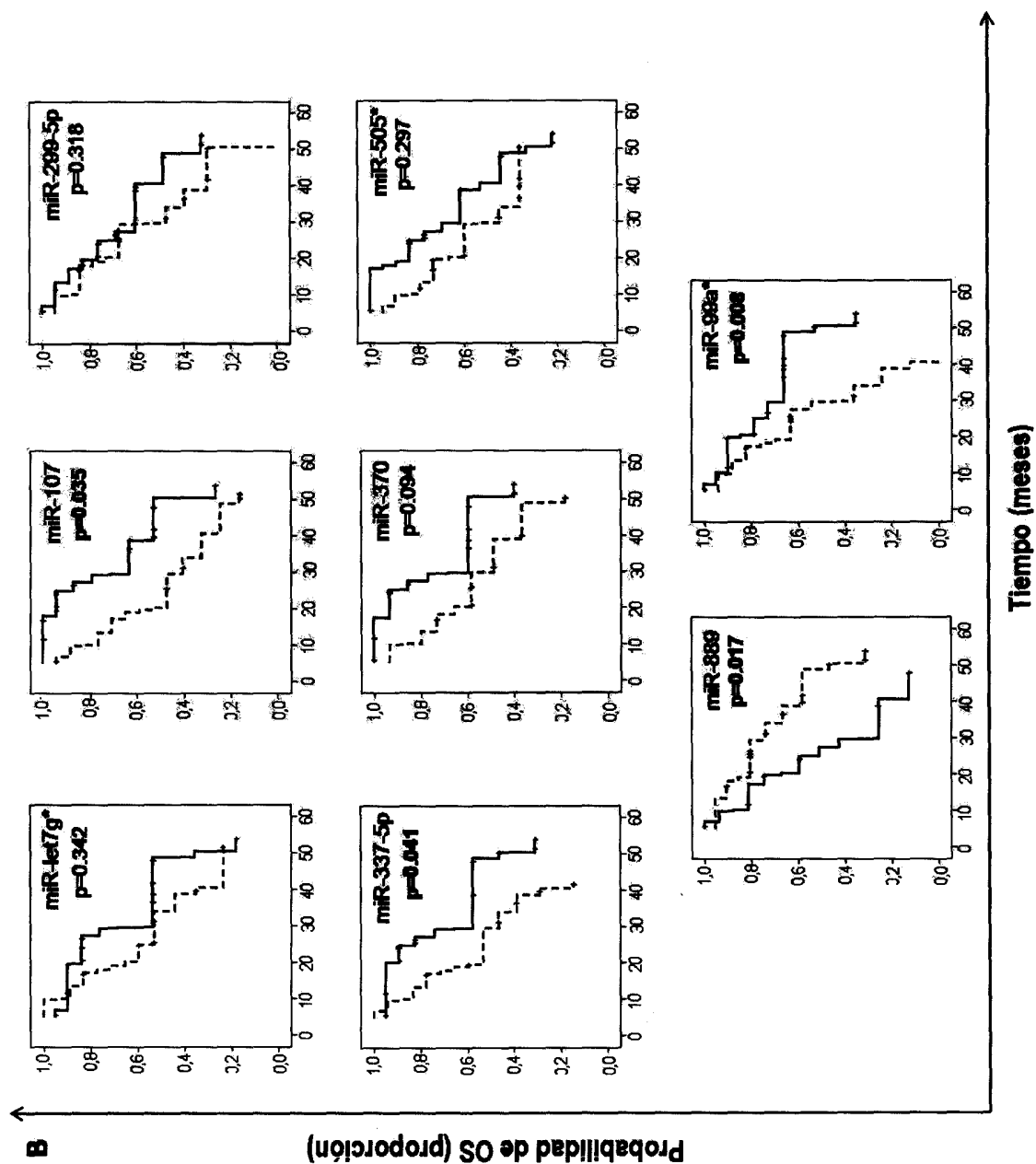


Figura 2 B

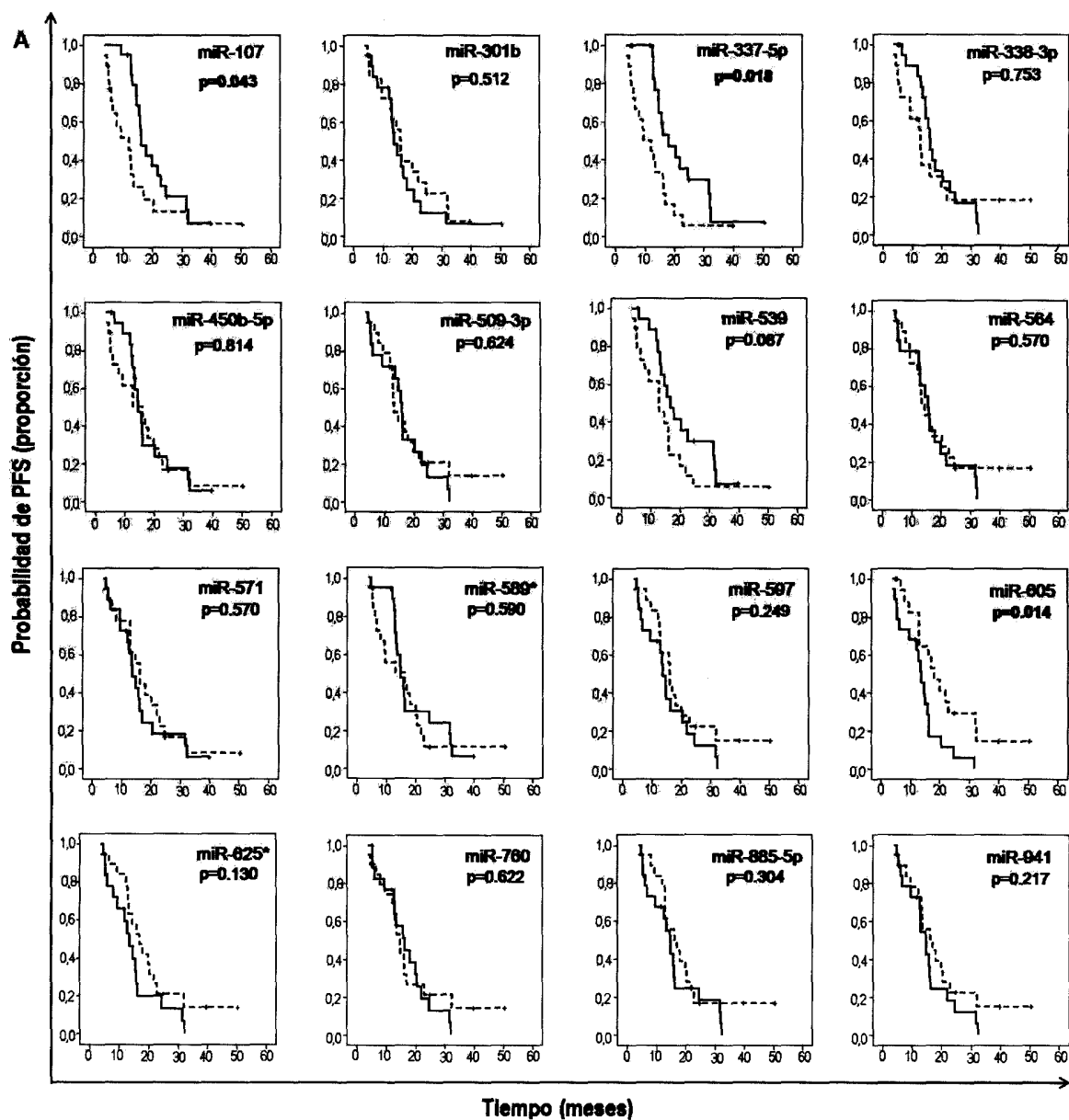


Figura 3 A

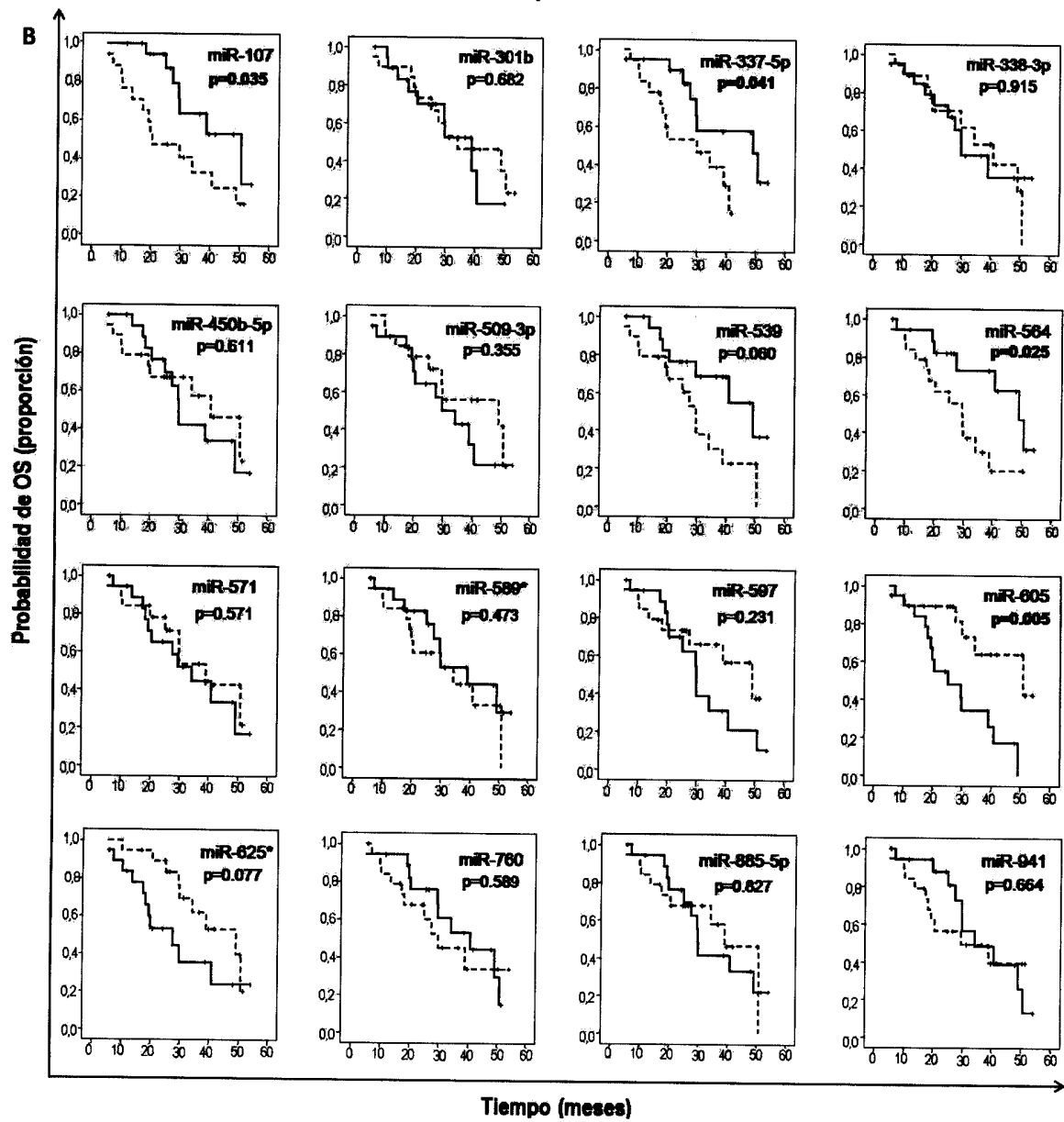


Figura 3 B

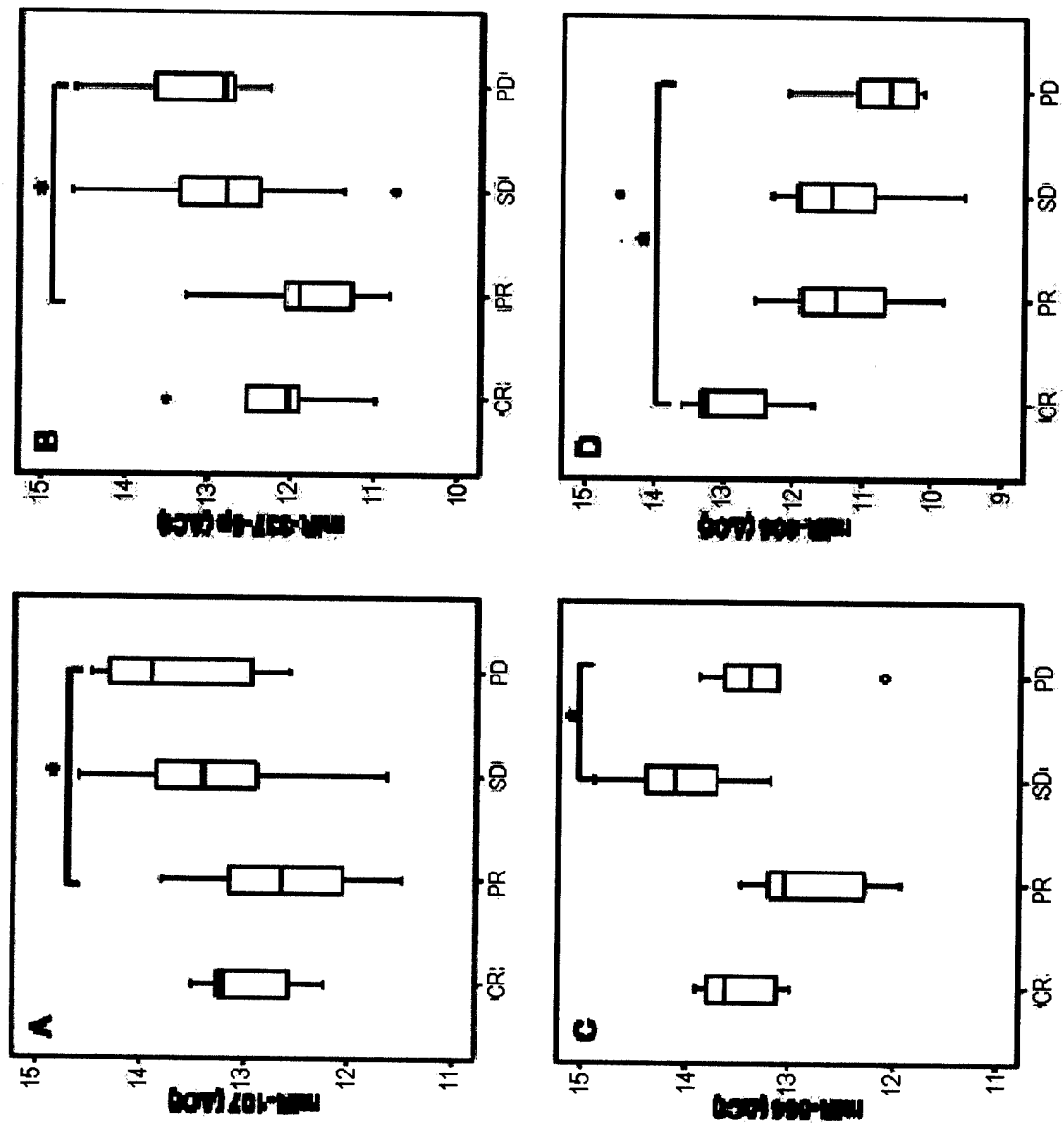


Figura 4

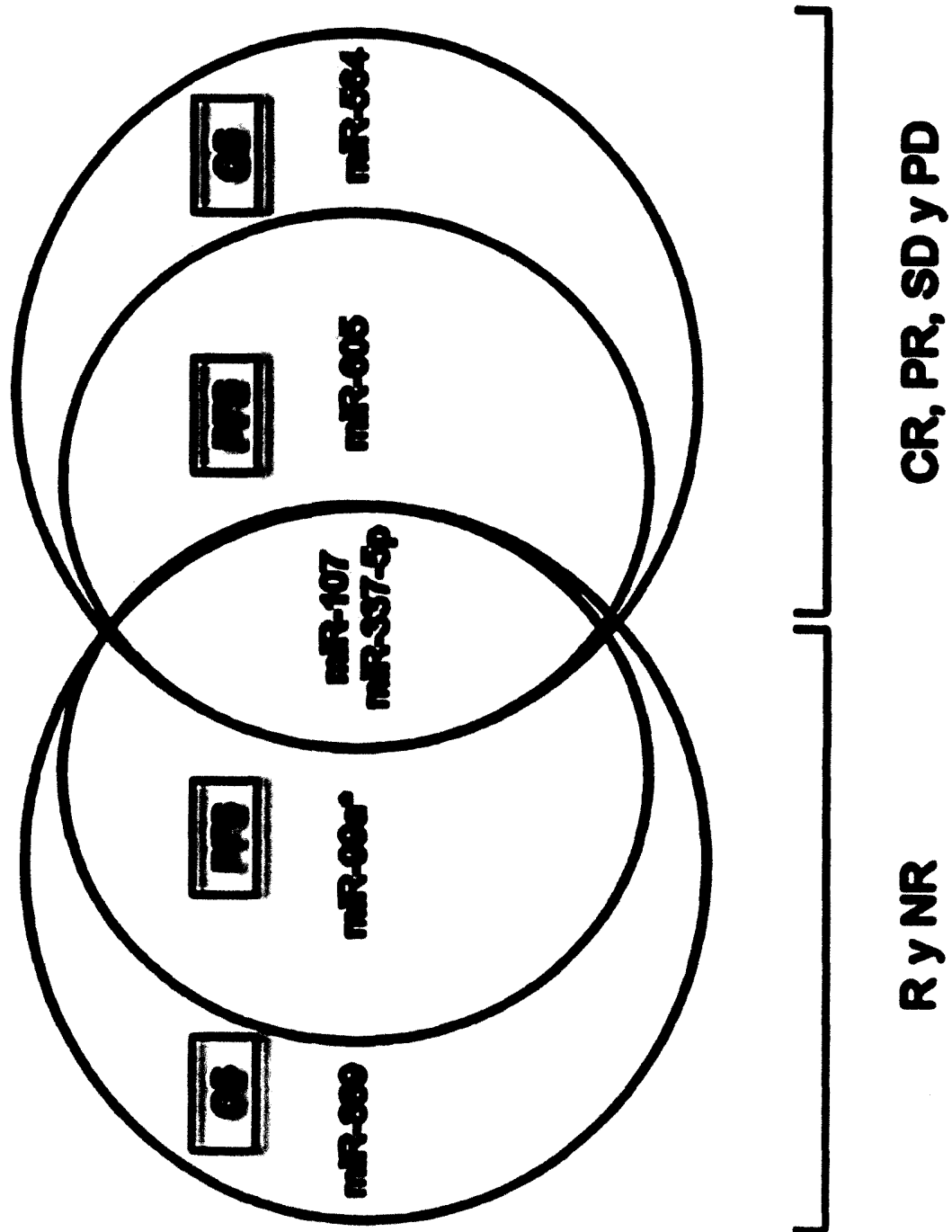


Figura 5