



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102009901762817
Data Deposito	07/09/2009
Data Pubblicazione	07/03/2011

Classifiche IPC

Titolo

PROFILI DI ESPRESSIONE DI MICRO-RNA NEL SANGUE PERIFERICO DI PAZIENTI AFFETTI DA EPATOCARCINOMA O CIRROSI EPATICA E LORO USI

DESCRIZIONE

Annessa a domanda di brevetto per INVENZIONE INDUSTRIALE
avente per titolo:

**"PROFILI DI ESPRESSIONE DI MICRO-RNA NEL SANGUE
PERIFERICO DI PAZIENTI AFFETTI DA EPATOCARCINOMA O
CIRROSI EPATICA E LORO USI"**

A nome: ISTITUTO NAZIONALE DI GENETICA MOLECOLARE - INGM
con sede in: Via Francesco Sforza 35 - 20122 MILANO

Mandatari: Ing. Giuseppe Righetti, Albo iscr. nr. 7 BM,
Ing. Dario ALDE, Albo iscr. nr. 1338B, Ing.
Matteo BARONI, Albo iscr. nr. 1064 BM, Ing.
Marco BELLASIO, Albo iscr. nr. 1088 B, D.ssa
5 Cristina BIGGI, Albo iscr. nr. 1239 B, Dott.
Carlo BOTTERO, Albo iscr. nr. 560 BM, Ing.
Marco BRASCA, Albo iscr. nr. 1094 BM, Ing.
Carlo Raoul GHIONI, Albo iscr. nr. 280 BM,
Ing. Simona INCHINGALO, Albo iscr. nr. 1341B,
10 Ing. Martino SALVADORI, Albo iscr. nr. 438 BM,
Ing. Marco SGOBBA, Albo iscr. nr. 1206 B, P.I.
Fabrizio TANSINI, Albo iscr. nr. 697 BM, Ing.
Luigi TARABBIA, Albo iscr. nr. 1005 BM, Ing.
15 Gianluca ZANELLATO, Albo iscr. nr. 1337B della
BUGNION S.p.A. domiciliati presso quest'ultima
in MILANO - Viale Lancetti 17.

La presente invenzione si riferisce ad un metodo per diagnosticare o prognosticare un epatocarcinoma, anche a stadi precoci, oppure per valutare il rischio di sviluppare un epatocarcinoma o per monitorare l'efficacia di una terapia antitumorale contro un epatocarcinoma.

L'epatocarcinoma è una delle neoplasie umane più aggressive e diffuse al mondo, caratterizzato da un decorso spesso sfavorevole. Le principali terapie a cui si ricorre in caso di epatocarcinoma riguardano la resezione chirurgica o il trapianto di fegato. Tuttavia, la ridotta percentuale di sopravvivenza post-operatoria (30-40% dopo cinque anni) e la frequente ricomparsa post-chirurgica di metastasi, nei pazienti soggetti ad un trattamento di resezione chirurgica, complicano notevolmente l'approccio clinico nei confronti dell'epatocarcinoma. Questo limite è ulteriormente esasperato dalla ridotta possibilità di un trattamento chirurgico che, infatti, è riservato solo ad una piccola percentuale di pazienti (circa il 20% dei pazienti con epatocarcinoma), in particolare quei pazienti in cui si riscontrano ridotte lesioni e parametri epatici relativamente normali.

Il trapianto di fegato come soluzione terapeutica efficace per l'epatocarcinoma è un argomento ancora oggi molto dibattuto e le opinioni in merito sono controverse a causa della bassa disponibilità di organi, ma soprattutto per la difficoltà di classificare ed individuare i candidati adeguati al trattamento, principalmente quando la patologia è nelle sue fasi iniziali.

Nonostante oggi per molte forme tumorali siano disponibili metodi di classificazione della progressione patologica, ben codificati e generalmente accettati, l'epatocarcinoma rappresenta un'eccezione. La

5 classificazione clinica dell'epatocarcinoma e le indicazioni terapeutiche correlate sono procedure molto complesse e dipendono sia dal grado di progressione tumorale, sia dalla funzione epatica residua. Esistono diversi sistemi di classificazione e stadiazione clinica

10 per il carcinoma epatico, tuttavia, la comunità scientifica non si è ancora pronunciata in merito al metodo più appropriato ed efficace. Pertanto, l'identificazione di specifici marcatori prognostici, in grado di rappresentare nuovi criteri di classificazione

15 e stadiazione applicabili ai pazienti affetti da epatocarcinoma, rappresenta un obiettivo indispensabile soprattutto perché da esso dipende la scelta del trattamento terapeutico più adeguato al paziente.

L'obiettivo di una stadiazione universalmente accettata

20 è potenzialmente utile per migliorare l'accuratezza della prognosi nel singolo paziente, favorire la selezione dei pazienti alle diverse terapie ed infine per conformare gruppi di pazienti in base all'efficacia terapeutica.

25 L'identificazione di bio-marcatori molecolari potrebbe offrire una speranza per il miglioramento della diagnosi o prognosi dell'epatocarcinoma, per valutare il rischio di sviluppare un epatocarcinoma e per monitorare l'efficacia di un trattamento terapeutico contro

30 l'epatocarcinoma.

In questo contesto, il problema tecnico alla base della

presente invenzione è di mettere a disposizione un metodo per la classificazione e la stadiazione di un epatocarcinoma che sia non invasivo, semplice e veloce, ma al tempo stesso accurato e riproducibile e che possa
5 rispondere all'esigenza di una classificazione e stadiazione "universale", utile a garantire la scelta del miglior trattamento terapeutico per ogni singolo paziente. Il termine "non invasivo" nel contesto della presente invenzione indica la possibilità, mediante un
10 semplice test del sangue, di realizzare cure su misura per i singoli pazienti a fronte di svantaggiose metodiche con immagini costose ed a biopsie invasive che ad oggi rappresentano il classico approccio clinico per la diagnosi, prognosi e quindi terapia del cancro. In
15 particolare un pannello specifico di biomarcatori, presenti e stabili nel circolo sanguigno, possono essere utilizzati come "impronta digitale" molecolare dell'epatocarcinoma.

Tale problema tecnico è risolto da un metodo per
20 diagnosticare o prognosticare un epatocarcinoma, anche a stadi precoci, per valutare il rischio di sviluppare un epatocarcinoma o per monitorare l'efficacia di una terapia antitumorale contro un epatocarcinoma come delineato nelle annesse rivendicazioni.

25 La presente invenzione riguarda un metodo per diagnosticare o prognosticare un epatocarcinoma, anche a stadi precoci, oppure per valutare il rischio di sviluppare un epatocarcinoma o per monitorare l'efficacia di una terapia antitumorale contro
30 l'epatocarcinoma, comprendente la misurazione, preferibilmente mediante RT-PCR quantitativa, del

livello di espressione di almeno un prodotto genico di un microRNA (miRNA) in un campione di sangue periferico oppure in un campione di fluido biologico, ed il confronto di detto livello di espressione misurato con un livello di riferimento.

L'alterazione dei livelli di espressione del prodotto genico di un miRNA in un campione del soggetto in analisi, rispetto ad un campione controllo, è indicativa del fatto che il soggetto è affetto da epatocarcinoma o ha un aumentato rischio di sviluppare un epatocarcinoma. Inoltre, l'alterazione dei livelli di espressione del prodotto genico di un miRNA in un campione del soggetto in analisi, rispetto ad un campione controllo è indicativa dell'efficacia, evoluzione ed esito di una terapia contro l'epatocarcinoma.

L'alterazione dei livelli di espressione del prodotto genico di un miRNA in un campione del soggetto in analisi, rispetto a un campione controllo è anche indicativa dell'evoluzione della malattia e quindi della sua prognosi.

Tale metodo può essere anche impiegato per diagnosticare o valutare il rischio di sviluppare una cirrosi epatica in pazienti, per esempio affetti da epatite cronica oppure sani, oppure per prognosticare l'evolversi di una cirrosi in pazienti affetti da cirrosi, oppure per monitorare l'efficacia di una terapia farmacologica contro la cirrosi epatica.

In questo caso, il metodo comprende la misurazione, preferibilmente mediante RT-PCR quantitativa, del livello di espressione di almeno un prodotto genico di un microRNA (miRNA) in un campione di sangue periferico

oppure in un campione di fluido biologico, ed il confronto di detto livello di espressione misurato con un livello di riferimento. L'alterazione dei livelli di espressione del prodotto genico di un miRNA in un
5 campione del soggetto in analisi, rispetto a un campione controllo è indicativa del fatto che il soggetto è affetto da cirrosi epatica o ha un aumentato rischio di sviluppare una cirrosi epatica, per esempio in pazienti affetti da epatite cronica.

10 Tale alterazione è anche indicativa dell'efficacia, evoluzione ed esito di una terapia contro la cirrosi epatica.

Tale alterazione dei livelli è anche indicativa dell'evoluzione della malattia e quindi della sua
15 prognosi.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi del metodo secondo la presente invenzione appariranno maggiormente chiari dai risultati sperimentali illustrati nelle unite figure, in cui:

20 - la Figura 1 mostra un grafico dei valori del rapporto dell'espressione relativa tra campioni di sangue di soggetti affetti da epatocarcinoma (HCC) e campioni di sangue di soggetti sani (controllo-HD); i valori tra 0 e 1 indicano miRNA iperespressi nei campioni di soggetti
25 sani, mentre i valori maggiori di 1 si riferiscono a miRNA iperespressi nei campioni di soggetti affetti da epatocarcinoma;

- la Figura 2 mostra una rappresentazione grafica mediante gradiente di colore (heatmap) dei valori di ΔCt
30 (Ct: Ciclo soglia) per i 62 miRNA differenzialmente espressi in maniera significativa secondo l'analisi t-

test tra 10 campioni di soggetti sani e 10 campioni di soggetti con epatocarcinoma HCC non accoppiati (p-value <0.05);

- la Figura 3 mostra il grafico dei valori del rapporto dell'espressione relativa tra campioni di sangue di 5
soggetti affetti da cirrosi epatica e campioni di sangue degli stessi soggetti cirrotici che hanno successivamente sviluppato epatocarcinoma; i valori tra 0 e 1 indicano i miRNA iperespressi nei campioni di 10
soggetti cirrotici, mentre valori maggiori di 1 si riferiscono a miRNA iperespressi nei campioni di soggetti con epatocarcinoma;

- la Figura 4 mostra una rappresentazione grafica, mediante gradiente di colore (heatmap), dei valori di 15
 ΔC_t per gli 11 miRNA differenzialmente espressi in maniera significativa nell'analisi di t-test appaiato tra 5 campioni di sangue di soggetti affetti da cirrosi epatica e 5 campioni di sangue degli stessi soggetti cirrotici che hanno successivamente sviluppato 20
epatocarcinoma.

I miRNA sono molecole naturalmente presenti in molti organismi inclusi animali, piante e virus e svolgono un ruolo fondamentale nel controllo dell'espressione genica, regolando, in modo specifico, la stabilità e la 25
traduzione degli RNA messaggeri (mRNA). I miRNA sono espressi inizialmente come lunghe molecole di RNA precursori, i pri-miRNA che, attraverso un complesso meccanismo di processamento nucleo-citoplasmatico, vengono trasformati nella forma matura (miRNA) 30
caratterizzata da una lunghezza di 17-24 nucleotidi. La funzione di molti miRNA non è nota; tuttavia, diversi

studi hanno dimostrato il ruolo chiave che i miRNA hanno nella regolazione genica in molte funzioni biologiche fondamentali come, l'apoptosi, lo sviluppo ematopoietico e il differenziamento cellulare.

5 La rilevanza biologica e clinica dei profili dell'espressione dei miRNA è stata dimostrata nei tumori solidi umani (come il tumore alla mammella) e nella leucemia linfatica cronica.

10 Ulteriore prerogativa dei miRNA è la loro presenza, in una forma stabile RNA resistente, nel sangue (siero e plasma) e in diversi altri fluidi biologici, infatti recentemente è stato dimostrato che il sangue di pazienti affetti da carcinoma alla prostata o cancro ovario evidenziano dei profili di espressione di miRNA
15 peculiari.

Per gli scopi della presente invenzione, l'almeno un prodotto genico di un miRNA utilizzato nel metodo è almeno un miRNA.

20 L'almeno un prodotto genico di un miRNA è scelto, singolarmente od in combinazione, nel gruppo costituito da SEQ ID NO 1-69.

In una forma preferita dell'invenzione, l'almeno un prodotto genico di un miRNA è selezionato, singolarmente od in combinazione, nel gruppo costituito da SEQ ID NO
25 1-19 e SEQ ID NO 63-66 e SEQ ID 69, più preferibilmente è scelto nel gruppo costituito da: SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16 e SEQ ID NO 65.

30 Tali sequenze di miRNA sono caratterizzate da un livello di espressione relativa maggiore in un campione di un

soggetto affetto da epatocarcinoma rispetto ad un controllo, che può essere un soggetto sano o cirrotico.

In un'altra forma preferita di realizzazione della presente invenzione, l'almeno un prodotto genico di un miRNA è selezionato, singolarmente od in combinazione, nel gruppo costituito da SEQ.ID NO 20-62 e SEQ.ID NO 67-68, più preferibilmente è scelto nel gruppo costituito da: SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 28, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, , SEQ ID NO 41 e SEQ ID NO 67.

Tali sequenze di miRNA sono caratterizzate da un livello di espressione relativa minore in campioni di soggetti affetti da epatocarcinoma rispetto ad un controllo, che può essere un soggetto sano o cirrotico.

In una forma preferita di realizzazione della presente invenzione l'almeno un prodotto genico di un miRNA è selezionato, singolarmente od in combinazione, tra le sequenze: SEQ ID NO 6, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 23, 28, 30, 31, 33, 36, 37, 39, 40, 41, 65 e 67.

Il metodo, oggetto della presente invenzione, è preferibilmente realizzato *in vitro*, in particolare su campioni di sangue o fluido biologico di un soggetto umano.

Il campione di sangue periferico oggetto dell'indagine può essere sangue intero, cellule mononucleate periferiche del sangue, siero o plasma isolati (*ex vivo*).

Il campione oggetto dell'indagine può essere anche un qualsiasi fluido biologico, per esempio urina o saliva.

Il metodo descritto si riferisce all'epatocarcinoma, in uno stadio avanzato o anche precoce, in particolare

all'epatocarcinoma trabecolare, pseudoghiandolare, compatto, o scirroso, con diversi gradi di differenziazione.

Il metodo dell'invenzione è impiegato per diagnosticare se un soggetto è affetto da epatocarcinoma oppure se è a rischio di sviluppare tale patologia verificando l'eventuale alterazione dei livelli di espressione del prodotto genico di un miRNA in un campione di sangue periferico o di fluido biologico del soggetto in analisi, rispetto ad un campione controllo.

Il metodo dell'invenzione è anche impiegato per definire la prognosi di un epatocarcinoma mediante la comparazione dei livelli di espressione di almeno un prodotto genico di un miRNA in un campione di sangue periferico o di fluido biologico di un soggetto affetto da epatocarcinoma ed un livello di riferimento. L'alterazione dei livelli di espressione dell'almeno un prodotto genico di un miRNA in un campione del soggetto in analisi, rispetto a un campione di riferimento è indicativa del grado di avanzamento del tumore dal quale è possibile dedurre la prognosi della malattia.

Il metodo dell'invenzione viene anche utilizzato per monitorare l'efficacia di un trattamento terapeutico anti-tumorale, in particolare un trattamento chemio/radio-terapico. In questo caso il metodo comprende la comparazione dei livelli di espressione di almeno un prodotto genico di un miRNA in un campione di sangue periferico o di fluido biologico del soggetto in analisi con un campione di riferimento. L'alterazione dei livelli di espressione dell'almeno un prodotto genico di un miRNA in un campione del soggetto in

analisi, rispetto a un campione dello stesso soggetto in fasi diverse del trattamento terapeutico in oggetto, è indicativa dell'efficacia del trattamento stesso.

In alternativa, il metodo per determinare l'efficacia di un trattamento terapeutico anti-tumorale comprende la comparazione di campioni di sangue periferico di pazienti, affetti da epatocarcinoma e soggetti a trattamento terapeutico anti-tumorale, e campioni di pazienti affetti da epatocarcinoma, ma non soggetti a trattamento terapeutico anti-tumorale. L'alterazione dei livelli di espressione del prodotto genico di un miRNA tra i due gruppi di pazienti è indicativa della validità e dell'efficacia o meno di un nuovo metodo di trattamento terapeutico anti-tumorale.

In una forma alternativa di realizzazione, il metodo dell'invenzione può essere anche impiegato per diagnosticare o valutare il rischio di sviluppare una cirrosi epatica, per esempio in pazienti affetti da epatite cronica o in pazienti sani, oppure per prognosticare l'evolversi di una cirrosi in pazienti affetti da cirrosi, oppure per monitorare l'efficacia di una terapia farmacologica contro la cirrosi epatica.

In questo caso, il metodo comprende la misurazione, preferibilmente mediante RT-PCR quantitativa, del livello di espressione di almeno un prodotto genico di un microRNA (miRNA) in un campione di sangue periferico oppure in un campione di fluido biologico, ed il confronto di detto livello di espressione misurato con un livello di riferimento. L'alterazione dei livelli di espressione del prodotto genico di un miRNA in un campione del soggetto in analisi, rispetto a un campione

controllo è indicativa del fatto che il soggetto è affetto da cirrosi epatica o ha un aumentato rischio di sviluppare una cirrosi epatica, per esempio in pazienti affetti da epatite cronica.

5 Tale alterazione è anche indicativa dell'efficacia, evoluzione ed esito di una terapia contro la cirrosi epatica.

Tale alterazione dei livelli è anche indicativa dell'evoluzione della malattia e quindi della sua
10 prognosi.

In questa forma di realizzazione il prodotto genico di un miRNA è come indicato in precedenza.

In un'altra forma di realizzazione, il metodo secondo la presente invenzione può anche essere utilizzato in
15 combinazione con altri metodi diagnostici/prognostici attualmente in uso, integrando validamente tali tecniche di indagine.

Per esempio, il metodo può essere applicato in combinazione con: microarray, analisi proteomiche ed
20 immunologiche, analisi di sequenziamento di specifiche sequenze di DNA, allo scopo di poter definire un approccio terapeutico *ad hoc* per il singolo paziente. Il completamento delle informazioni cliniche provenienti dalle tecniche di indagine note e quella oggetto della
25 presente invenzione aiuterebbe ad affrontare la cura del paziente, affetto da epatocarcinoma o da cirrosi, in maniera completamente personalizzata e vantaggiosa sia per quanto riguarda la diagnosi, sia per la prognosi e la terapia.

In un'altra forma di realizzazione, il metodo dell'invenzione può essere utilizzato per identificare nuovi bersagli terapeutici.

Infatti, ciascun miRNA ha la capacità di regolare l'espressione di centinaia di geni e quindi può modulare l'attività di molte vie molecolari di trasduzione del segnale all'interno della cellula. Pertanto, i pannelli di miRNA identificati nel sangue periferico di un soggetto affetto da tumore, riflettono la biologia del tumore primario.

Tali miRNA sono utili come biomarcatori nell'identificazione della patologia, per definire la risposta alle terapie e per la sorveglianza di eventuali ricorrenze dell'epatocarcinoma. Tali miRNA sono anche utili per definire le vie molecolari alterate nell'epatocarcinoma e contribuire, quindi, a identificare nuovi bersagli terapeutici.

La presente invenzione si riferisce anche ad una composizione farmaceutica, per trattare un epatocarcinoma o la cirrosi epatica, comprendente un carrier farmaceuticamente accettabile ed almeno un prodotto genico di miRNA isolato, e/o un acido nucleico ad esso complementare, che risulta essere up o down regolato nel sangue periferico di un soggetto affetto da un epatocarcinoma o da cirrosi epatica, rispetto ad un campione di controllo adatto. L'almeno un prodotto genico di miRNA isolato è scelto, singolarmente od in diverse combinazioni, tra le sequenze identificate precedentemente.

La presente invenzione si riferisce ulteriormente ad un metodo per identificare un agente anti-epatocarcinoma o

anti-cirrosi epatica che comprende un passaggio in cui si somministra una sostanza test a cellule isolate (ex-vivo). Dopo la somministrazione, si misura il livello di almeno un prodotto genico di un miRNA e la cui aumentata espressione è associata all'epatocarcinoma o alla cirrosi epatica.

Successivamente si confronta il livello di espressione di detto almeno un prodotto genico di un miRNA nelle cellule trattate rispetto a cellule di controllo. Un abbassamento di detto livello di espressione, è indicativo del fatto che la sostanza test è un anti-epatocarcinoma o un anti-cirrosi epatica.

PARTE SPERIMENTALE

ESEMPIO 1

Le indagini sono state effettuate su dieci soggetti affetti da epatocarcinoma.

Il tessuto analizzato è costituito da sangue periferico ed il controllo sperimentale è rappresentato dal sangue periferico di dieci soggetti privi dei sintomi e di tracce di tumore.

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit mirVanaTM miRNA Isolation Kit (Cat# AM1561- Ambion). Come normalizzatore quantitativo è stato aggiunto l'RNA sintetico ath-miR159a (3 fmoli per aliquota di siero), microRNA di *Arabidopsis thaliana* non espresso nell'uomo. Un'aliquota di campione (3 µL dei 50 µL totali di RNA estratto) è stata sottoposta alla reazione di retrotrascrizione condotta, utilizzando il kit TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription, in presenza di una soluzione di MgCl₂ 5 mM (Part no. 4366597 - Applied Biosystems). Come primers per la retrotrascrizione sono

stati utilizzati Megaplex™ RT Primers, un set di 2 pools predefiniti (Pool A e Pool B) di 380 RT primers ognuno, che permette la sintesi simultanea di cDNAs da mi RNA maturi (Megaplex™ RT Primers Human Pool A, Part No.: 4399966; Human Pool B, Part No.: 4399968 - Applied Biosystems). Volume finale di reazione (µL): 7.5.

Condizioni di incubazione per un ciclo di reazione:

16 °C 2 min

42 °C 1 min

10 50 °C 1 sec

85 °C 5 min

4 °C ∞

(per 40 cicli)

Il cDNA, così prodotto, è stato pre-amplificato (2.5 µL dei 7.5) utilizzando TaqMan PreAmp Master Mix (2x) (Part No.: 4384266 - Applied Biosystems) e Megaplex™ PreAmp Primers, un set di 2 pools di primers gene-specifici, forward e reverse (Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A, Part no. 4399233; Human Pool B (Part no. 4399201 - Applied Biosystems). Volume finale di reazione (µL): 25.

Condizioni di incubazione:

95 °C 10 min

55 °C 2 min

72 °C 2 min

25 95 °C 15 sec

60 °C 4 min x 12 cicli

4 °C ∞

Il cDNA pre-amplificato è stato utilizzato per la reazione di real-time PCR. La reazione è stata condotta utilizzando TaqMan Universal PCR Master Mix, No Amperase UNG, 2X (Part No: 4326614 - Applied Biosystems) in 900

5 μ L finali e caricata su 2 set di cards di microfluidica, TaqMan[®] Human MicroRNA Low Density Arrays (Part No.: 4400238 - Applied Biosystems), a 384 pozzetti ognuna, contenenti sonde TaqMan. Tale analisi (Array A e Array B) consente la quantificazione dei livelli di espressione genica di 665 miRNA e dei relativi controlli (http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/portal/documents/generaldocuments/cms_052133.xls).

10 Il controllo interno ath-miR159a può essere usato per calcolare la relativa espressione genica. L'espressione relativa di ogni miRNA può essere calcolata utilizzando l'equazione $2^{-\Delta Ct}$, dove $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{ath-miR159a}$. L'espressione relativa di ogni miRNA, calcolata attraverso la PCR, può essere analizzata utilizzando
15 metodi statistici, come t test o ANOVA. I dati di ΔCt sono sottoposti ad analisi "Hierarchical clustering" e i relativi risultati visualizzati in un grafico "heatmap" (vedi Fig. 2).

20 L'analisi per "RT quantitative PCR" ha mostrato la presenza di 62 miRNA, elencati nella Tabella 1, che sono presenti in quantità maggiore o inferiore nei soggetti con epatocarcinoma rispetto ai controlli.

Tabella 1:

miRNA	raw p-val	higher in	Target Sequence	Numero Sequenza miRNA
hsa-miR-223	1.69E-06	HD	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	SEQ ID NO 28
hsa-miR-483-5p	3.17E-05	HCC	AAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG	SEQ ID NO 16
hsa-miR-16	3.75E-05	HD	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	SEQ ID NO 33
hsa-miR-122	2.41E-04	HCC	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	SEQ ID NO 14
hsa-miR-29a	2.93E-04	HD	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	SEQ ID NO 36

hsa-miR-140-5p	3.73E-04	HD	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	SEQ ID NO 31
hsa-miR-532-3p	3.98E-04	HD	CCUCCACACCCAAGGCUUGCA	SEQ ID NO 32
hsa-miR-590-5p	7.41E-04	HD	GAGCUUAUUCAUAAAAGUGCAG	SEQ ID NO 37
hsa-miR-24	0.001326056	HD	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	SEQ ID NO 41
hsa-miR-195	0.001366361	HD	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	SEQ ID NO 38
hsa-miR-197	0.001388423	HD	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	SEQ ID NO 39
hsa-miR-643	0.002119931	HCC	ACUUGUAUGCUAGCUCAGGUAG	SEQ ID NO 10
hsa-miR-93	0.002347399	HD	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	SEQ ID NO 46
hsa-miR-222	0.00249573	HD	AGCUACAUCUGGCUCUGGGU	SEQ ID NO 45
hsa-miR-571	0.002797201	HCC	UGAGUUGGCCAUCUGAGUGAG	SEQ ID NO 13
hsa-miR-23a	0.002827722	HD	AUCACAUUGCCAGGGAUUUC	SEQ ID NO 23
hsa-miR-877	0.003071473	HCC	GUAGAGGAGAUGGCGCAGGG	SEQ ID NO 9
hsa-miR-19b	0.003224636	HD	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA	SEQ ID NO 43
hsa-miR-132	0.003554063	HD	UAAACAGUCUACAGCCAUGGUCC	SEQ ID NO 35
hsa-miR-520c-3p	0.004731762	HCC	AAAGUGCUCUUUUAGAGGGU	SEQ ID NO 7
hsa-miR-19a	0.005161863	HD	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA	SEQ ID NO 44
hsa-miR-885-5p	0.005185759	HCC	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU	SEQ ID NO 15
hsa-miR-188-5p	0.005383855	HCC	CAUCCUUGCAUGGUGGAGGG	SEQ ID NO 3
hsa-miR-494	0.005799115	HD	UGAAACAUACACGGGAAACCUC	SEQ ID NO 34
hsa-miR-559	0.00580249	HCC	UAAAGUAAAUAUGCACCAAAA	SEQ ID NO 12
hsa-miR-331-5p	0.007425596	HD	CUAGGUUAGGUCCAGGGAUCC	SEQ ID NO 30
hsa-miR-142-3p	0.007429025	HD	UGUAGUGUUCUACUUUAUGGA	SEQ ID NO 53
hsa-miR-15b	0.010680858	HD	UAGCAGCACAUCAUGGUUACA	SEQ ID

				NO 47
hsa-miR-140-3p	0.011537802	HD	UACCACAGGGUAGAACCACGG	SEQ ID NO 42
hsa-miR-25	0.012526199	HD	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	SEQ ID NO 48
hsa-miR-760	0.012662118	HCC	CGGCUCUGGGUCUGUGGGGA	SEQ ID NO 6
hsa-miR-199a-3p	0.014095253	HD	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	SEQ ID NO 51
hsa-miR-655	0.014120932	HD	AUAAUACAUGGUUAACCUCUUU	SEQ ID NO 49
hsa-miR-567	0.014409184	HCC	AGUAUGUUCUCCAGGACAGAAC	SEQ ID NO 19
hsa-miR-345	0.014628208	HD	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	SEQ ID NO 55
hsa-miR-20a	0.015044568	HD	UAAAGUGC UUAUAGUGCAGGUAG	SEQ ID NO 57
hsa-miR-365	0.015725587	HD	UAAUGCCCUAAAAUCCUUU	SEQ ID NO 50
hsa-miR-628-5p	0.01646383	HD	AUGCUGACAUUUUACUAGAGG	SEQ ID NO 21
hsa-miR-509-3p	0.017252065	HCC	UGAUUGGUACGUCUGUGGUAG	SEQ ID NO 5
hsa-miR-579	0.017330982	HD	UUCAUUUGGUUAAACCGGAU	SEQ ID NO 27
hsa-miR-223*	0.01885562	HCC	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU	SEQ ID NO 1
hsa-miR-99b*	0.022084232	HCC	CAAGCUCGUGUCUGUGGUCCG	SEQ ID NO 4
hsa-miR-145*	0.023664307	HD	GGAUUCCUGGAAAUCUGUUCU	SEQ ID NO 29
hsa-miR-107	0.023735054	HD	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUA	SEQ ID NO 22
hsa-miR-1	0.02399486	HD	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUUAU	SEQ ID NO 25
hsa-miR-377	0.026372321	HD	AUCACACAAAGGCAACUUUUGU	SEQ ID NO 26
hsa-miR-454	0.02798928	HD	UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGGU	SEQ ID NO 54
hsa-let-7g	0.029252954	HD	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	SEQ ID NO 61
hsa-miR-193a-5p	0.029725004	HD	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	SEQ ID NO 40
hsa-miR-451	0.03039734	HD	AAACCGUACCAUUCUGAGUU	SEQ ID NO 60

hsa-let-7b	0.031215172	HD	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU	SEQ ID NO 56
hsa-miR-625*	0.0320151	HD	GACUUAAGAACUUUCCCCUCA	SEQ ID NO 52
hsa-miR-191	0.035316132	HD	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG	SEQ ID NO 59
hsa-miR-18b	0.036119234	HD	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG	SEQ ID NO 20
hsa-miR-375	0.036783654	HCC	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	SEQ ID NO 18
hsa-miR-210	0.038199093	HD	CUGUGCGUGUGACAGCGCGUGA	SEQ ID NO 24
hsa-miR-573	0.038235087	HCC	CUGAAGUGAUGUGUAACUGAUCAG	SEQ ID NO 8
hsa-miR-645	0.039255172	HCC	UCUAGGCUUGUACUGCUGA	SEQ ID NO 11
hsa-miR-641	0.039353	HCC	AAAGACAUAGGAUAGAGUCACCUC	SEQ ID NO 17
hsa-miR-19b-1*	0.04526782	HCC	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	SEQ ID NO 2
hsa-miR-93*	0.04676072	HD	ACUGCUGAGCUAGCACUCCCG	SEQ ID NO 62
hsa-miR-186	0.04824365	HD	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	SEQ ID NO 58

In particolare nella Tabella 2 sono riportati i miRNA presenti in quantità maggiore nei campioni dei soggetti affetti da epatocarcinoma rispetto ai controlli sani:

5 Tabella 2:

Nome MicroRNA (miRNA)	Sequenza MicroRNA (miRNA)	Numero Sequenza miRNA
hsa-miR-223*	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU	SEQ ID NO 1
hsa-miR-19b-1*	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	SEQ ID NO 2
hsa-miR-188-5p	CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGG	SEQ ID NO 3
hsa-miR-99b*	CAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCG	SEQ ID NO 4
hsa-miR-509-3p	UGAUUGGUACGUCUGUGGGUAG	SEQ ID NO 5
hsa-miR-760	CGGCUCUGGGUCUGUGGGGA	SEQ ID NO 6
hsa-miR-520c-3p	AAAGUGCUCUCCUUUAGAGGGU	SEQ ID NO 7

hsa-miR-573	CUGAAGUGAUGUGUAACUGAUCAG G	SEQ ID NO 8
hsa-miR-877	GUAGAGGAGAUGGCGCAGGG	SEQ ID NO 9
hsa-miR-643	ACUUGUAUGCUAGCUCAGGUAG	SEQ ID NO 10
hsa-miR-645	UCUAGGCUGGUACUGCUGA	SEQ ID NO 11
hsa-miR-559	UAAAGUAAUAUGCACCAAAA	SEQ ID NO 12
hsa-miR-571	UGAGUUGGCCAUCUGAGUGAG	SEQ ID NO 13
hsa-miR-122	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	SEQ ID NO 14
hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU	SEQ ID NO 15
hsa-miR-483-5p	AAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG	SEQ ID NO 16
hsa-miR-641	AAAGACAUAGGAUAGAGUCACCU C	SEQ ID NO 17
hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	SEQ ID NO 18
hsa-miR-567	AGUAUGUUCUCCAGGACAGAAC	SEQ ID NO 19

In particolare nella Tabella 3 sono riportati i miRNA presenti in quantità minore nei soggetti affetti da epatocarcinoma rispetto ai controlli sani:

5 Tabella 3:

Nome MicroRNA (miRNA)	Sequenza MicroRNA (miRNA)	Numero Sequenza miRNA
hsa-miR-18b	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG	SEQ ID NO 20
hsa-miR-628-5p	AUGCUGACAUUUUACUAGAGG	SEQ ID NO 21
hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC	SEQ ID NO 22
hsa-miR-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	SEQ ID NO 23
hsa-miR-210	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	SEQ ID NO 24
hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	SEQ ID NO 25
hsa-miR-377	AUCACACAAAGGCAACUUUUGU	SEQ ID NO 26
hsa-miR-579	UUCAUUUGGUAUAAACCGCGAUU	SEQ ID NO 27
hsa-miR-223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	SEQ ID NO 28
hsa-miR-145*	GGAUCCUGGAAAUACUGUUCU	SEQ ID NO 29

hsa-miR-331-5p	CUAGGUAUGGUCCCAGGGAUCC	SEQ ID NO 30
hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	SEQ ID NO 31
hsa-miR-532-3p	CCUCCACACCCAAGGCUUGCA	SEQ ID NO 32
hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	SEQ ID NO 33
hsa-miR-494	UGAAACAUACACGGGAAACCUC	SEQ ID NO 34
hsa-miR-132	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	SEQ ID NO 35
hsa-miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	SEQ ID NO 36
hsa-miR-590-5p	GAGCUUAUUCAUAAAAGUGCAG	SEQ ID NO 37
hsa-miR-195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	SEQ ID NO 38
hsa-miR-197	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	SEQ ID NO 39
hsa-miR-193a-5p	UGGGUCUUJGCGGGCGAGAUGA	SEQ ID NO 40
hsa-miR-24	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	SEQ ID NO 41
hsa-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAACCACGG	SEQ ID NO 42
hsa-miR-19b	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA	SEQ ID NO 43
hsa-miR-19a	UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA	SEQ ID NO 44
hsa-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	SEQ ID NO 45
hsa-miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	SEQ ID NO 46
hsa-miR-15b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	SEQ ID NO 47
hsa-miR-25	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	SEQ ID NO 48
hsa-miR-655	AUAAUACAUGGUUAACCUCUUU	SEQ ID NO 49
hsa-miR-365	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU	SEQ ID NO 50
hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	SEQ ID NO 51
hsa-miR-625*	GACUAUAGAACUUUCCCCUCA	SEQ ID NO 52
hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUCCUACUUUAUGGA	SEQ ID NO 53
hsa-miR-454	UAGUGCAAUAUUGCJUUAUAGGGU	SEQ ID NO 54
hsa-miR-345	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	SEQ ID NO 55
hsa-let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	SEQ ID NO 56
hsa-miR-20a	UAAAGUGCJUUAUAGUGCAGGUAG	SEQ ID NO 57
hsa-miR-186	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	SEQ ID NO 58
hsa-miR-191	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	SEQ ID NO 59
hsa-miR-451	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU	SEQ ID NO 60
hsa-let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	SEQ ID NO 61
hsa-miR-93*	ACUGCUGAGCUAGCACUCCCG	SEQ ID NO 62

Nella Figura 1 sono riportati i valori di rapporto dell'espressione relativa dei miRNA tra campioni di soggetti affetti da epatocarcinoma (HCC) e campioni di
5 soggetti controllo sani (HD). Valori tra 0 e 1 indicano miRNA iperespressi nei campioni sani, mentre valori maggiori di 1 si riferiscono a miRNA iperespressi nei campioni di epatocarcinoma.

Nella Figura 2 è riportata la rappresentazione grafica
10 mediante gradiente di colore (heatmap) dei valori di ΔCt per i 62 miRNA differenzialmente espressi in maniera significativa secondo l'analisi t-test tra 10 campioni di pazienti sani e 10 campioni di pazienti affetti da epatocarcinoma HCC non accoppiati (p-value <0.05). Il
15 gradiente di valore va dal bianco (massima espressione, basso valore di ΔCt) al nero (minima espressione, massimo valore di ΔCt). Colonne: i 20 campioni considerati, 10 campioni da donatori sani (codice "DctHD#") e 10 da donatori affetti da epatocarcinoma
20 (codice "DctHCC#") dove "#" indica l'ID del campione. Righe: i 62 miRNA significativi con relativi nomi standard. Relazioni di similitudine tra campioni e tra miRNA in base ai loro valori di espressione sono espressi graficamente dai dendrogrammi in Figura 2,
25 calcolati in maniera automatica (unsupervised) con il metodo della distanza euclidea.

ESEMPIO 2

E' stata analizzata la presenza di miRNA nel sangue
30 periferico di cinque soggetti con epatocarcinoma e come controllo si è usato il sangue periferico degli stessi

soggetti prelevato prima dello sviluppo dell'epatocarcinoma quando evidenziavano un profilo clinico cirrotico.

Un'analisi per "RT quantitative PCR", condotta ed analizzata come riportato nell'esempio 1, ha mostrato la presenza di 11 miRNA, descritti nella Tabella 4, che sono presenti in quantità maggiore o inferiore nei soggetti con epatocarcinoma rispetto ai controlli.

10 Tabella 4:

miRNA	raw p-val	higher in	Target Sequence	Numero Sequenza miRNA
hsa-miR-599	0.0032	HCC	GUUGUGUCAGUUUAUCAAC	SEQ ID NO 69
hsa-miR-485-3p	0.0049	HCC	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU	SEQ ID NO 64
hsa-miR-29a	0.0057	CIRR	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	SEQ ID NO 36
hsa-miR-23a	0.0184	CIRR	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	SEQ ID NO 23
hsa-miR-193a-5p	0.0202	CIRR	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	SEQ ID NO 40
hsa-miR-299-3p	0.0248	HCC	UAUGUGGGGAUGGUAACCGCUU	SEQ ID NO 65
hsa-miR-138-1*	0.0272	HCC	GCUACUUCACAACACCAGGGCC	SEQ ID NO 63
hsa-miR-519d	0.0292	CIRR	CAAAGUGCCUCCUUUAGAGUG	SEQ ID NO 67
hsa-miR-133b	0.0306	HCC	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA	SEQ ID NO 66
hsa-miR-760	0.0347	HCC	CGGCUCUGGGUCUGUGGGGA	SEQ ID NO 6
hsa-miR-190b	0.0352	CIRR	UGAUUAUGUUUGAUUAUUGGGUU	SEQ ID NO 68

In particolare i miRNA riportati nella Tabella 5 sono presenti in quantità maggiore nei campioni dei soggetti affetti da epatocarcinoma rispetto ai campioni dei soggetti cirrotici (controllo):

5

Tabella 5:

MicroRNA (miRNA)	Sequenza MicroRNA (miRNA)	Numero Sequenza micro RNA (miRNA)
hsa-miR-138-1*	GCUACUUCACAACACCAGGGCC	SEQ ID NO 63
hsa-miR-760	CGGCUCUGGGUCUGUGGGGA	SEQ ID NO 6
hsa-miR-599	GUUGUGUCAGUUUAUCAAAC	SEQ ID NO 69
hsa-miR-485-3p	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU	SEQ ID NO 64
hsa-miR-299-3p	UAUGUGGGAUGGUAAACCGCUU	SEQ ID NO 65
hsa-miR-133b	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA	SEQ ID NO 66

In particolare i miRNA riportati nella Tabella 6 sono presenti in quantità minore nei campioni dei soggetti affetti da epatocarcinoma rispetto ai campioni dei soggetti cirrotici (controlli):

10

Tabella 6:

Nome MicroRNA (miRNA)	Sequenza MicroRNA (miRNA)	Numero Sequenza micro RNA (miRNA)
hsa-miR-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	SEQ ID NO 23
hsa-miR-193a-5p	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	SEQ ID NO 40
hsa-miR-519d	CAAAGUGCCUCCCUUAGAGUG	SEQ ID NO 67
hsa-miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	SEQ ID NO 36
hsa-miR-190b	UGAUAUGUUUGAUAUUGGGUU	SEQ ID NO 68

Nella Figura 3 sono riportati i valori di rapporto dell'espressione relativa dei miRNA differenzialmente espressi nei soggetti cirrotici prima e dopo la comparsa dell'epatocarcinoma. Valori tra 0 e 1 indicano i miRNA iperespressi nei campioni sani, mentre valori maggiori di 1 si riferiscono a miRNA iperespressi nei campioni di soggetti affetti da epatocarcinoma.

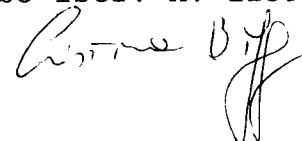
Nella Figura 4 è riportata la rappresentazione grafica, mediante gradiente di colore (heatmap), dei valori di ΔCt per gli 11 miRNA differenzialmente espressi in maniera significativa nell'analisi t-test tra 5 campioni di sangue di soggetti affetti da cirrosi epatica e 5 campioni di sangue degli stessi soggetti cirrotici che hanno successivamente sviluppato epatocarcinoma.

Il gradiente di valore va dal bianco (massima espressione, basso valore di ΔCt) al nero (minima espressione, massimo valore di ΔCt). Colonne: i 10 campioni considerati, 5 cirrotici (codice "Dctcirr#") e 5 epatocarcinomi (codice "DctHCC#") dove "#" indica l'ID del campione. Righe: gli 11 miRNA significativi con relativi nomi standard.

Relazioni di similitudine tra campioni e tra miRNA in base ai loro valori di espressione sono espressi graficamente dai dendrogrammi in Figura 4, calcolati in maniera automatica (unsupervised) con il metodo della distanza euclidea.

IL MANDATARIO

Dr. Cristina Biggi
(Albo iscr. n. 1239B)



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per diagnosticare o prognosticare un epatocarcinoma, anche a stadi precoci, oppure per valutare il rischio di sviluppare un epatocarcinoma o per monitorare l'efficacia di una terapia antitumorale contro l'epatocarcinoma comprendente i seguenti step:
- 5
- a) misurare in un campione *isolato* di sangue periferico o fluido biologico il livello di espressione di almeno un prodotto genico di un miRNA;
- 10
- b) confrontare detto livello di espressione misurato con un livello di riferimento.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto almeno un prodotto genico di un miRNA è scelto nel gruppo costituito da SEQ ID NO 1-69 o loro combinazioni.
- 15
3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui detto almeno un prodotto genico di un miRNA è scelto nel gruppo costituito da SEQ ID NO 6, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 23, 28, 30, 31, 33, 36, 37, 39, 40, 41, 65 e 67.
- 20
4. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 3, in cui detto almeno un prodotto genico di un miRNA è scelto nel gruppo costituito da SEQ ID NO 1-19 e SEQ ID NO 63-66 e SEQ ID 69 o loro combinazioni, preferibilmente nel gruppo costituito da SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16 e SEQ ID NO 65.
- 25
5. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 4, in cui detto almeno un prodotto genico di un miRNA è scelto nel gruppo costituito da SEQ.ID NO
- 30

20-62 e SEQ.ID NO 67-68 o loro combinazioni, preferibilmente nel gruppo costituito da SEQ ID NO 28, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40,
5 SEQ ID NO 41 e SEQ ID NO 67.

6. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 5, in cui detto campione di sangue periferico è scelto tra sangue intero, cellule mononucleate periferiche del sangue, siero o plasma;
10 detto campione di fluido biologico è scelto tra urina o saliva.

7. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 6, in cui detto metodo per monitorare l'efficacia di un trattamento terapeutico anti-tumorale, comprende la misurazione dell'alterazione dei
15 livelli di espressione dell'almeno un prodotto genico di un miRNA in un campione del soggetto in analisi, rispetto ad un campione dello stesso soggetto in fasi diverse del trattamento terapeutico anti-tumorale.

20 8. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 6, in cui detto metodo per monitorare l'efficacia di un trattamento terapeutico anti-tumorale, comprende la comparazione di campioni di sangue periferico di pazienti, affetti da
25 epatocarcinoma e soggetti a trattamento terapeutico antitumorale, e campioni di pazienti affetti da epatocarcinoma, ma non soggetti a trattamento terapeutico antitumorale e la misurazione dell'alterazione dei livelli di espressione del
30 prodotto genico di un miRNA tra i due gruppi di pazienti.

9. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 8, in cui detto metodo è un metodo per diagnosticare o valutare il rischio di sviluppare una cirrosi epatica, oppure per prognosticare l'evolversi di una cirrosi epatica in pazienti affetti da cirrosi, oppure per monitorare l'efficacia di una terapia farmacologica contro la cirrosi epatica.
10. Uso del metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 9 per identificare nuovi bersagli terapeutici.
11. Composizione farmaceutica comprendente un carrier farmaceuticamente accettabile ed almeno un prodotto genico di miRNA, isolato, secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 2 alla 5 e/o un acido nucleico ad esso complementare.
12. Composizione secondo la rivendicazione 11 per l'uso nel trattamento di un epatocarcinoma o per il trattamento della cirrosi epatica.

20

IL MANDATARIO

Dr Cristina Biggi

(Albo iscr. n. 1239 B)

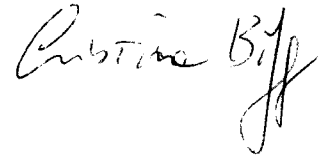


Fig. 1

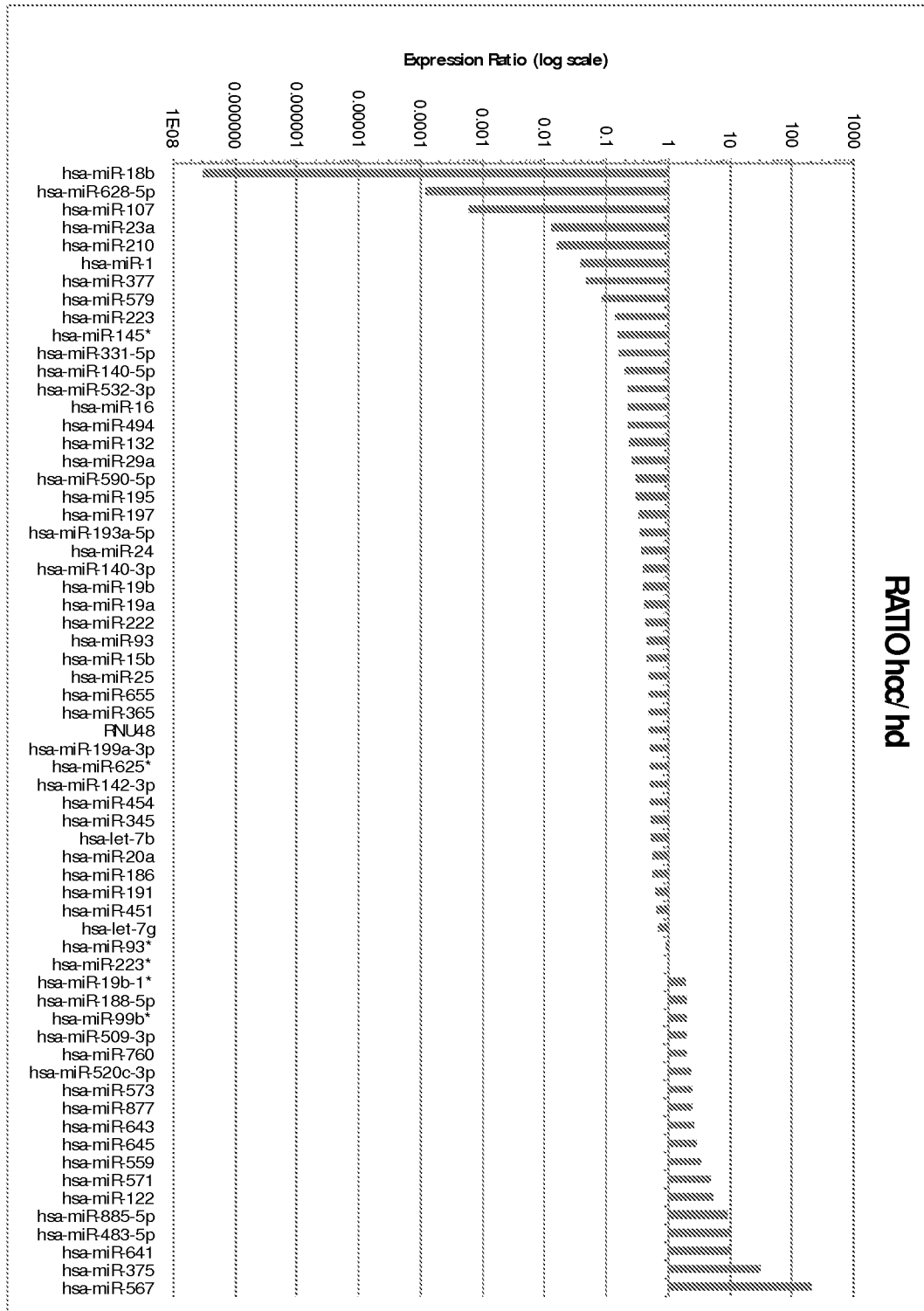


Fig. 2

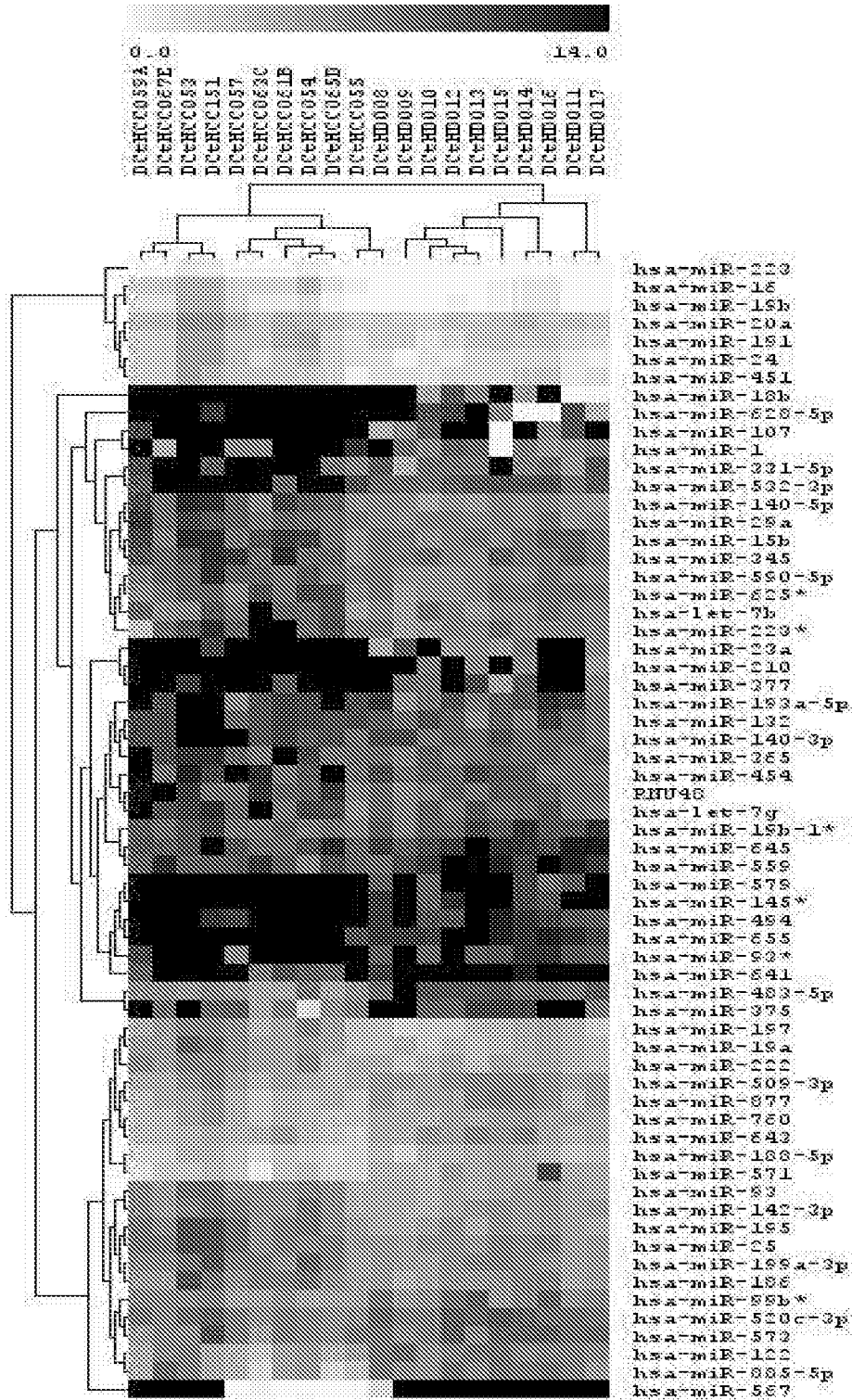


Fig. 3

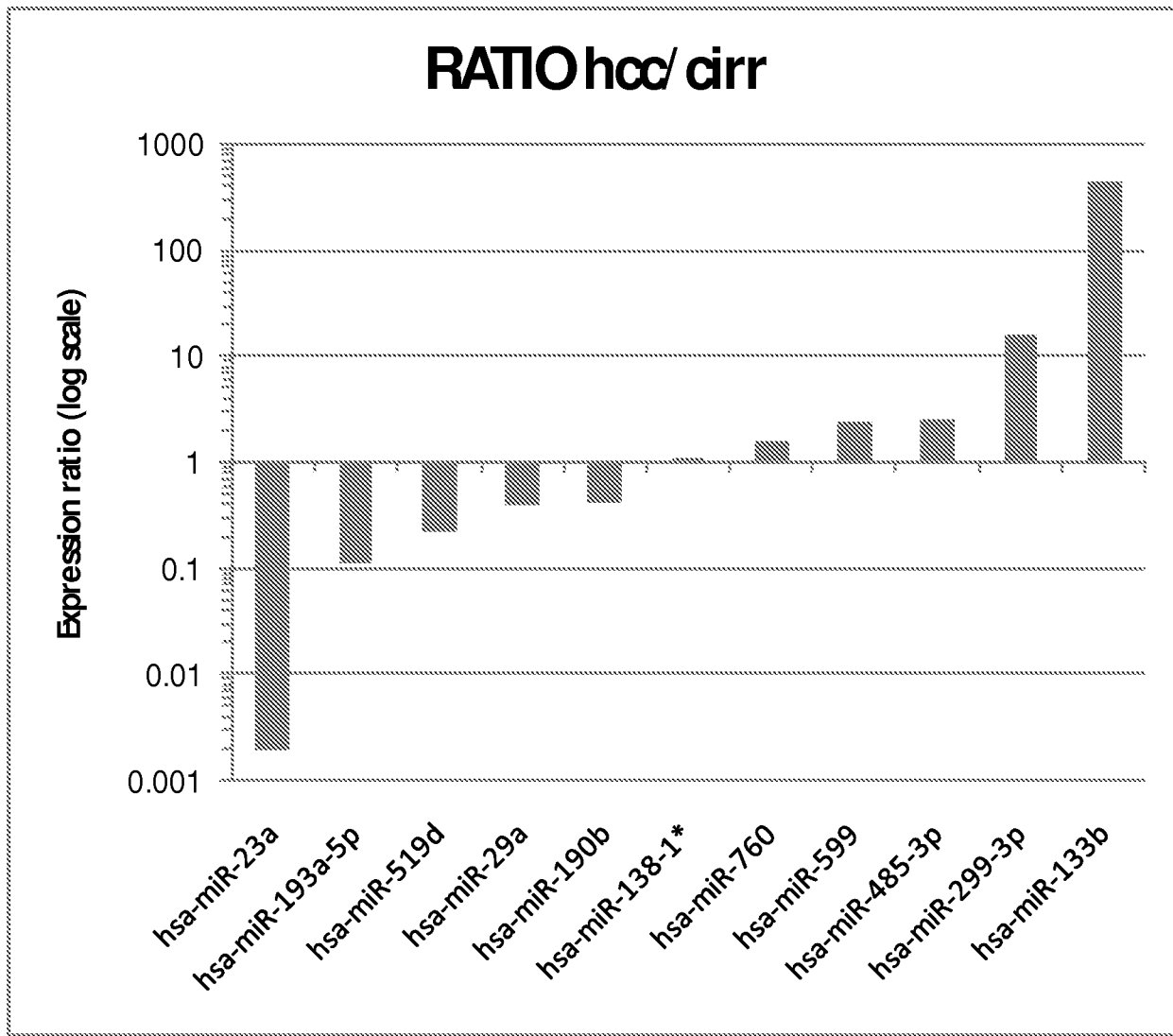


Fig. 4

