



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 280**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02763327 .0**

96 Fecha de presentación : **23.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1421215**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

54 Título: **Métodos para evaluar estados patológicos usando ARN extracelular.**

30 Prioridad: **25.07.2001 US 308054 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2011

73 Titular/es: **ONCOMEDX Inc.**
23 Wellington Drive
Long Valley, New Jersey 07853, US

72 Inventor/es: **Kopreski, Mike**

74 Agente: **Miltenyi Null, Peter**

ES 2 367 280 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para evaluar estados patológicos usando ARN extracelular

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención cubre 12 realizaciones tal como sigue:

- 5 1. Un método para detectar, diagnosticar o monitorizar una lesión de un órgano en un ser humano, comprendiendo el método la etapa de detectar cualitativa o cuantitativamente ARN de humano extracelular en un líquido corporal obtenido previamente de dicho ser humano, en el que dicho ARN humano se detecta sometiendo a ensayo para detectar dicho ARN humano o ADNc derivado del mismo, de manera cualitativa o cuantitativa, en el que la lesión de un órgano es lesión traumática o isquémica del cerebro o el corazón.
- 10 2. El método según 1, en el que la lesión traumática o isquémica del cerebro o el corazón es un accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, lesión cerebral isquémica, hipoxia del cerebro o traumatismo craneoencefálico.
3. El método según 1 ó 2, en el que el líquido corporal se selecciona de sangre, plasma sanguíneo, orina, líquido cefalorraquídeo o suero.
- 15 4. Un método para detectar ARN humano extracelular en sangre, plasma sanguíneo o suero, u otro líquido corporal, todos ellos, sangre, plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, obtenidos previamente de un ser humano, en el que dicho ARN está asociado con una lesión de un órgano de dicho ser humano, comprendiendo el método las etapas de:
- 20 a) extraer ARN de sangre, plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal de un ser humano, en el que una parte de dicho ARN extraído comprende un ARN humano extracelular asociado con una lesión de un órgano de dicho ser humano;
- b) amplificar *in vitro* o amplificar la señal de una fracción del ARN extraído o ADNc derivado del mismo de manera cuantitativa o cualitativa usando cebadores o sondas específicos para una secuencia de ácido nucleico humana de dicho ARN humano extracelular, o ADNc derivado del mismo, para producir una señal o producto amplificado;
- 25 c) detectar la señal o el producto amplificado producido de ese modo,
- en el que la lesión de un órgano es lesión traumática o isquémica del cerebro o el corazón.
5. El método según 4, en el que dicho ARN humano extracelular se deriva del corazón o el cerebro de dicho ser humano.
- 30 6. El método según 4 ó 5, mediante el cual se detecta, diagnostica o monitoriza una lesión de un órgano.
7. El método según 4, 5 ó 6, en el que dicho órgano es el corazón o el cerebro del ser humano.
8. El método según cualquiera de 4 a 7, en el que el ARN humano traduce una proteína que tiene un efecto perjudicial sobre las células o los tejidos dentro del ser humano.
- 35 9. Un método de detección de ARN humano extracelular obtenido de plasma o suero de un ser humano, estando asociado dicho ARN humano con una lesión de un órgano de dicho ser humano, comprendiendo el método las etapas de:
- a) extraer ARN de plasma sanguíneo o suero de un ser humano, en el que una parte de dicho ARN comprende un ARN humano extracelular asociado con una lesión de un órgano de dicho ser humano;
- 40 b) hibridar una parte de dicho ARN humano extracelular asociado con una lesión de un órgano de dicho ser humano, o ADNc derivado del mismo, con un cebador, una sonda o un sustrato sólido, en el que el cebador, la sonda o el sustrato sólido es específico para secuencias de nucleótidos humanas de dicho ARN humano extracelular, o ADNc derivado del mismo;
- c) detectar el ADNc o ARN hibridado,
- en el que la lesión de un órgano es una lesión traumática o isquémica del cerebro o el corazón.
- 45 10. El método según 4 ó 9, en el que dicho ARN humano es ARNm de troponina T cardiaca, ARNm de troponina I cardiaca, ARNm de cadena pesada de beta-miosina, ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos ácido o ARNm de Par-4.
11. El método según 9, en el que dicho ARN humano extracelular se deriva del corazón o el cerebro.

12. El método según 4 ó 9, en el que dicha lesión de un órgano es una de un grupo que comprende infarto de miocardio, isquemia miocárdica, insuficiencia cardiaca congestiva, cardiomiopatía, accidente cerebrovascular, lesión cerebral isquémica, estados hipóxicos del cerebro y traumatismo craneoencefálico.

Esta descripción ilustra métodos para diagnosticar, detectar, evaluar y monitorizar enfermedades y estados patológicos no neoplásicos en un animal, preferiblemente un ser humano. Dichas enfermedades y estados patológicos incluyen, entre otros, enfermedades y estados patológicos que afectan a órganos corporales específicos y los que afectan a múltiples órganos o sistemas de órganos corporales, y los estados patológicos que están asociados con enfermedad o lesión, o que son predictivos de una enfermedad o que pueden dar como resultado en última instancia una enfermedad. Tal como se expone en el presente documento, la descripción ilustra métodos para detectar ácido ribonucleico (ARN) de mamífero en dicho plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal del animal. Los métodos permiten de ese modo la evaluación de la expresión génica que está asociada con, es el resultado de, o es predictiva de enfermedades o estados patológicos o traumatismo o lesión celular. La descripción también ilustra métodos que permiten que se monitorice la respuesta celular y la recuperación de enfermedades y estados patológicos así como de lesión celular. De ese modo, la descripción ilustra métodos para evaluar y monitorizar la respuesta a terapias específicas para dichos estados patológicos, enfermedades y lesiones. La descripción también ilustra específicamente métodos para evaluar y monitorizar células y tejidos no hematopoyéticos o no hematológicos que están diferenciados de manera terminal. En estos métodos, se detecta ARN extracelular derivado de dichas células y tejidos en un líquido corporal. La descripción también ilustra el diagnóstico, la detección, la evaluación y/o la monitorización de enfermedades y estados patológicos que afectan a tejidos y células que no proliferan, tales como los del corazón, cerebro y músculo. Por tanto, el enfoque es particularmente ventajoso para evaluar enfermedades y estados patológicos del sistema cardiovascular, el sistema nervioso y de los músculos esqueléticos. La descripción ilustra además la detección de células y tejidos no neoplásicos que proliferan de manera normal o son el resultado de una enfermedad o lesión. La descripción ilustra la detección de ARN de mamífero extracelular asociado con una enfermedad no neoplásica que no se transcribe a partir de un sitio frágil o que no contiene secuencias de ácido nucleico virales o bacterianas.

Aunque las etiologías de las enfermedades y los estados patológicos no neoplásicos son variadas, el proceso patológico está asociado a menudo de manera característica con la producción o sobreproducción intracelular, o el escape o la liberación, de proteínas específicas de la célula que pueden caracterizar la célula. Tales proteínas pueden estar implicadas en respuestas adaptativas celulares, o pueden ser indicativas de lesión celular, o reflejar la producción de proteínas asociadas con el propio estado patológico. Además, pueden sobreproducirse dentro de una célula, o secretarse desde la célula, o liberarse inapropiadamente de la célula, proteínas normalmente asociadas con el metabolismo de la célula o el tejido. En la práctica clínica, se ha utilizado la detección de proteínas en sangre y otros líquidos corporales en el diagnóstico y la monitorización de la enfermedad. Sin embargo, no todas tales proteínas pueden detectarse en la sangre o los líquidos corporales, a menudo debido a que la proteína o bien no se secreta o libera de la célula, o bien existe en la sangre a niveles por debajo de los límites de detección para un estadio dado de la enfermedad, particularmente en estadios tempranos o subclínicos de la enfermedad. Por tanto, existe una necesidad de nuevos métodos que proporcionen el análisis de la expresión génica celular de manera más sensible.

El ácido ribonucleico (ARN) es esencial para producir proteínas celulares, y puede usarse la detección y monitorización de ARN de mamífero para evaluar la expresión génica celular. Además, puesto que el ARN y el ácido desoxirribonucleico (ADN) pueden hibridarse y amplificarse de manera cualitativa o cuantitativa usando métodos de amplificación de ácidos nucleicos, puede realizarse la detección de ARN con alta sensibilidad. Aunque la técnica anterior contenía informes esporádicos que sugerían que podría detectarse ARN en plasma y suero (por ejemplo, Wiczorek *et al.*, 1985 Proc Natl Acad Sci USA 82: 3455-3459; Wiczorek *et al.*, 1987 Cancer Res. 47: 6407-6412; Wiczorek *et al.*, 1989 Schweiz med Wschr 119: 1342-1343; Kamm y Smith, 1972 Clin. Chem. 18: 519-522), hasta hace poco se desconocía si existían especies de ARN específicas en plasma o suero con suficiente integridad para amplificarse y detectarse. La patente estadounidense de titularidad conjunta n.º 6.329.179 B1 proporciona métodos para detectar ARN tumoral extracelular en plasma sanguíneo, suero y líquidos corporales. Tras la fecha de prioridad de la solicitud de titularidad conjunta, varios autores han confirmado que puede amplificarse ARN tumoral a partir de plasma o suero (Kopreski *et al.*, 1999 Clin. Cancer Res. 5: 1961-1965; Chen *et al.*, 2000 Clin. Cancer Res. 6: 3823-3826; Dasi *et al.*, 2001 Lab. Invest. 81: 767-769; Hasselmann *et al.*, 2001 Oncology Reports 8: 115-118; Kopreski *et al.*, 2001 Clin. Chem. 47: 362, resumen 9; Fleishhacker *et al.*, 2001 Clin. Chem. 47: 369, resumen 48; Reinhold *et al.*, 2001 Clin. Chem. 47: 369, resumen 50; Gocke *et al.*, 2001 Clin. Chem. 47: 369, resumen 51), y además que puede detectarse ARN fetal en el plasma materno (Poon *et al.*, 2001 Clin. Chem. 47: 363, resumen 11). Estos hallazgos son notables puesto que está bien establecido en la técnica que las ribonucleasas presentes en la sangre degradan rápidamente el ARN de mamífero (Reddi y Holland, 1976 Proc Nat Acad Sci USA 73: 2308-2310), y además que en consecuencia no puede amplificarse ARN libre a partir de plasma o suero tras lisis celular (Komeda *et al.*, 1995 Cancer 75: 2214-2219; Pfeleiderer *et al.*, 1995 Int. J. Cancer 64: 135-139). También se ha demostrado que hay ARN de mamífero en suero en asociación con ácido nucleico viral y sitios frágiles, tal como en asociación con células cancerosas hematológicas (Urnovitz *et al.*, 1999 Clin. Diag. Lab. Immunology 6: 330-335; Urnovitz, patente estadounidense con número de serie 6.344.317, documento WO98/14617). Dado que la etiología y fisiología del ARN extracelular sigue sin conocerse, la detección de ARN extracelular en procesos patológicos no neoplásicos, no mediados por virus, y particularmente a partir de células y tejidos no hematológicos que incluyen tejidos que no proliferan y células y tejidos diferenciados de manera terminal de órganos sólidos lesionados o enfermos, era tanto desconocida como inesperada.

La neoplasia se caracteriza por procesos fisiopatológicos que a menudo difieren de los de una enfermedad no neoplásica. De manera similar, el desarrollo fetal puede verse como un proceso proliferativo de células que experimentan diferenciación caracterizado por procesos fisiológicos que a menudo difieren de los que se producen en una enfermedad no neoplásica. Se desconocía en la técnica que el ARN de mamífero extracelular derivado de tejido de órganos sólidos no neoplásico pudiese detectarse en el plasma sanguíneo, suero u otros líquidos corporales de individuos con enfermedad a niveles superiores a los presentes en el plasma sanguíneo o suero o líquido corporal de individuos sanos. Esto es particularmente cierto para ARN no mediado por virus, no neoplásico específico para las células y los tejidos no hematológicos o no hematopoyéticos diferenciados de manera terminal, que no proliferan del corazón y el cerebro.

10 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para diagnosticar, evaluar o monitorizar en un ser humano, la existencia de una lesión, que es una lesión traumática o isquémica del cerebro o el corazón. En realizaciones preferidas, el método comprende la etapa de detectar ARN de mamífero extracelular en un líquido corporal de un animal, preferiblemente sangre y lo preferiblemente plasma sanguíneo o suero, orina, derrames, ascitis, saliva, líquido cefalorraquídeo, secreciones cervicales, secreciones vaginales, secreciones endometriales, secreciones gastrointestinales, esputos y secreciones bronquiales, y/o lavados asociados, en el que dicho ARN está presente en el líquido corporal de un animal con una lesión celular, y no está presente en el líquido corporal de un animal sano, o en el que dicho ARN está presente en un líquido corporal de un animal con una lesión celular en cantidades cuantitativas que son mayores que las presentes en el líquido corporal de un animal sano.

La invención proporciona métodos para amplificar y detectar ARN de mamífero extracelular asociado con dicha lesión en sangre, más preferiblemente en plasma sanguíneo o suero, o en otros líquidos corporales, comprendiendo el método las etapas de extraer ARN de dicho líquido corporal, amplificar *in vitro* o amplificar la señal de una fracción del ARN extraído o ADNc derivado del mismo, o bien cuantitativa o bien cualitativamente, y detectar la señal o el producto amplificado producido de ese modo.

En una realización preferida, el ARN se deriva de una célula o un tejido no hematológico o no hematopoyético. En un aspecto de esta realización, el ARN se deriva de una célula o un tejido que no prolifera. En un segundo aspecto, el ARN se deriva de una célula o un tejido diferenciado de manera terminal. En un tercer aspecto, el ARN no contiene secuencias de ácido nucleico virales. En un cuarto aspecto, el ARN no se deriva de la transcripción de un sitio frágil.

La invención en las realizaciones anteriores 1-12 proporciona métodos para detectar ARN de mamífero extracelular específico de tejido o específico de órgano presente en plasma, suero y/u otro líquido corporal mediante hibridación, en los que el ARN se deriva de células y/o tejido no hematológicos o no hematopoyéticos, no neoplásicos específicos de un ser humano, o ADNc derivado del mismo, con un cebador, sonda, sustrato sólido o superficie de contacto bioeléctrica específicos, comprendiendo el método las etapas de extraer ARN de dicho líquido corporal, e hibridar una parte del ARN extraído o ADNc derivado del mismo con un cebador, sonda, sustrato sólido o superficie de contacto bioeléctrica específicos que consiste en secuencias de oligonucleótido complementarias a ARN, o ADNc relacionado de células y/o tejido no hematológicos o no hematopoyéticos, no neoplásicos, específicos.

En realizaciones preferidas, el ARN extracelular detectado usando los métodos de esta invención no se amplifican. En un aspecto de esta realización, el ARN no contiene secuencias de ácido nucleico virales. En un segundo aspecto de esta realización, el ARN no se transcribe a partir de un sitio frágil. En un tercer aspecto de la realización, las células ó los tejidos están diferenciados de manera terminal. En un cuarto aspecto de esta realización, las células o los tejidos no proliferan.

La invención en las realizaciones anteriores 1-12 proporciona métodos para detectar y monitorizar ARN de mamífero o ADN derivado del mismo, en sangre, preferiblemente plasma sanguíneo, y suero, y otros líquidos corporales de un animal, más preferiblemente de un ser humano, que está asociado con células y tejido no hematológicos o no hematopoyéticos afectados por una lesión o enfermedad no neoplásica, comprendiendo el método las etapas de extraer ARN de dicho líquido corporal, amplificar *in vitro* o amplificar la señal de una fracción del ARN extraído o ADNc derivado del mismo, de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar la señal o el producto amplificado producido de ese modo.

En un aspecto de esta realización, el ARN no contiene secuencias de ácido nucleico virales o retrovirales. En un segundo aspecto de esta realización, el ARN no se transcribe a partir de un sitio frágil. En un tercer aspecto de esta realización, las células o los tejidos están diferenciados de manera terminal. En un cuarto aspecto, las células o los tejidos no proliferan.

La invención en las realizaciones anteriores 1-12 proporciona métodos para detectar y monitorizar ARN de mamífero o ADNc derivado del mismo en sangre, preferiblemente plasma sanguíneo o suero, u otro líquido corporal de un animal, más preferiblemente de un ser humano, que se deriva de células o tejidos no neoplásicos, en el que dicho ARNm produce una proteína que tiene un efecto perjudicial consiguiente sobre otras células o tejidos no neoplásicos diferentes, dando como resultado de ese modo un estado patológico o enfermedad de las células o los tejidos o su(s) órgano(s) y sistema(s) de órgano(s) afectado(s) de manera perjudicial de ese modo. En esta realización, el método

comprende las etapas de extraer ARN de plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, amplificar *in vitro* o amplificar la señal del ARN o ADNc derivado del mismo, de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar la señal o el producto amplificado producido de ese modo.

5 En un aspecto de esta realización, el ARN no contiene secuencias de ácido nucleico virales o retrovirales. En otro aspecto de esta realización, el ARN no se transcribe a partir de un sitio frágil. En otro aspecto de esta realización, las células o los tejidos están diferenciados de manera terminal. En otro aspecto de esta realización, las células o los tejidos no proliferan.

10 La invención en las realizaciones anteriores proporciona métodos para detectar y monitorizar ARN de mamífero o ADNc derivado del mismo en sangre, más preferiblemente plasma o suero, y/u otro líquido corporal de un animal, más preferiblemente de un ser humano, que está asociado con células o tejidos no hematológicos o no hematopoyéticos diferenciados de manera terminal, no neoplásicos, incluyendo tejidos o bien sanos o bien enfermos, comprendiendo el método las etapas de extraer ARN de dicho líquido corporal, amplificar *in vitro* o amplificar la señal del ARN extraído o ADNc derivado del mismo de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar la señal o el producto amplificado producido de ese modo.

15 En un aspecto de esta realización, la presente invención proporciona métodos para detectar ARN humano asociado con células y tejidos no hematológicos o no hematopoyéticos que son característicos de tejido(s) u órgano(s) o sistema(s) de órganos específico(s), o bien enfermo(s) o bien sano(s). En este aspecto, los métodos de la invención comprenden las etapas de extraer ARN de sangre, lo más preferiblemente plasma sanguíneo o suero, u otro líquido corporal, amplificar *in vitro* o amplificar la señal de ARN que comprende dicho ARN extraído o ADNc derivado del mismo, asociado con células y tejidos no hematológicos de órgano(s) o sistema(s) de órganos específico(s), de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y luego detectar la señal o el producto amplificado. Las células y los tejidos son los del corazón o el sistema cardiovascular, y las células y los tejidos son los del cerebro o el sistema nervioso.

20 En un segundo aspecto de esta realización, la invención proporciona métodos para detectar ARN de mamífero a partir de un tejido no hematológico o no hematopoyético, no proliferativo en un líquido corporal tal como sangre, plasma sanguíneo, suero o líquido cefalorraquídeo. En este aspecto, los métodos de la invención comprenden las etapas de extraer ARN humano de dicho líquido corporal, amplificar *in vitro* o amplificar la señal de una fracción del ARN extraído o ADNc derivado del mismo, que comprende dicho ARN extraído asociado con un tejido no hematológico o no hematopoyético, no proliferativo, de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y luego detectar la señal o el producto amplificado de ese modo. El tejido no proliferativo es tejido del corazón, preferiblemente tejido de músculo cardiaco o el tejido no proliferativo es tejido cerebral, preferiblemente tejido neural.

25 En realizaciones preferidas de los métodos de la invención, se extrae ARN humano extracelular de un líquido corporal tal como sangre completa, plasma sanguíneo o suero, o líquido cefalorraquídeo, usando un método de extracción tal como el método de extracción con gelatina; método de extracción con sílice, perla de vidrio o diatomeas; métodos de extracción a base de fenol-ácido-tiocianato de guanidinio; métodos de extracción a base de ácido-tiocianato de guanidinio; métodos que usan centrifugación a través de gradientes de cloruro de cesio o similares; métodos de extracción a base de fenol-cloroformo; u otros métodos de extracción de ARN disponibles comercialmente. La extracción puede realizarse adicionalmente usando sondas que hibridan específicamente con ARN específico, incluyendo sondas unidas a sustratos sólidos o a perlas magnéticas o partículas similares.

30 En realizaciones preferidas de los métodos de la invención, el ARN humano o ADNc derivado del mismo, o una señal derivada de los mismos, se amplifica usando un método de amplificación tal como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR); la reacción en cadena de la ligasa; amplificación de señal de ADN; indicadores de ARN amplificables; replicación mediante Q-beta; amplificación basada en transcripción; amplificación isotérmica basada en la secuencia de ácido nucleico; ensayos de replicación de secuencia autosostenida; amplificación de ADN boomerang; activación por desplazamiento de cadena; tecnología de sonda cíclica; o cualquier combinación o variación de las mismas.

35 En realizaciones preferidas de los métodos de la invención, la detección de un producto de amplificación del ARN humano o ADNc derivado del mismo o señal derivada de los mismos se logra usando un método de detección tal como electroforesis en gel; electroforesis capilar; ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) convencional o modificaciones del mismo, tales como amplificación usando cebadores biotinilados o modificados de otra forma; hibridación de ácido nucleico usando sondas marcadas de manera detectable, específicas, tales como sonda marcada con fluorescencia, radioisótopos o de manera cromogénica; detección de fluorescencia inducida por láser; análisis de transferencia de tipo Northern; análisis de transferencia de tipo Southern; electroquimioluminiscencia; detección por transferencia puntual inversa; y cromatografía de líquidos de alta resolución.

40 En realizaciones particularmente preferidas de los métodos de la invención, se convierte ARN humano en ADNc usando transcriptasa inversa tras la extracción de ARN de un líquido corporal y antes de la amplificación.

45 Los métodos de las realizaciones 1-12 de la invención se usan ventajosamente para proporcionar un diagnóstico de una lesión tal como se describió anteriormente. Los métodos de la invención son particularmente útiles para proporcionar un diagnóstico o monitorización de lesiones del corazón y el sistema cardiovascular. La enfermedad

cardiovascular es una de las enfermedades humanas no neoplásicas potencialmente mortales más comunes en todo el mundo. Los métodos de la invención permiten el diagnóstico, la detección, la evaluación y la monitorización de la enfermedad cardiovascular, incluyendo pero sin limitarse a enfermedades y estados patológicos del corazón tales como infarto de miocardio, isquemia miocárdica, insuficiencia coronaria, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía, aterosclerosis, hiperplasia de la íntima y rechazo de trasplante cardíaco, y estados asociados con angina, y estados y enfermedades asociados con aterosclerosis e hiperplasia de la íntima o hiperplasia de células de músculo liso, y enfermedades y estados patológicos asociados con hipertensión. Los métodos de la invención proporcionan una detección cualitativa o cuantitativa del ARN extracelular en el plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal de un ser humano, y en el que el ARN está asociado con enfermedad cardiovascular o estados patológicos, incluyendo los del corazón y los de la vasculatura, o con células y tejidos del corazón, las arterias y las venas. El ARN extracelular asociado con enfermedad cardiovascular y estados patológicos y/o lesión incluye, pero no se limita a ARN de troponina T cardíaca (ARN de TnTc), ARN de troponina I cardíaca (ARN de TnIc), ARN de cadena pesada de beta-miosina, ARN del factor de crecimiento de fibroblastos ácido (factor de crecimiento de unión a heparina-1), ARN del factor de crecimiento de fibroblastos básico y ARN del factor de crecimiento derivado de las plaquetas A y B (ARN de PDGF-A y ARN de PDGF-B). Debe entenderse que estas especies de ARN proporcionan ejemplos y no una limitación de la invención.

Los métodos de la invención son además particularmente útiles para proporcionar un diagnóstico de lesiones tal como se definió anteriormente. Los métodos de la invención pueden aplicarse a lesiones del cerebro tal como se definió anteriormente. Los métodos de la invención permiten diagnosticar, detectar, evaluar y monitorizar enfermedades y estados del sistema nervioso central, incluyendo pero sin limitarse a accidente cerebro vascular, lesión cerebral isquémica, estados hipóxicos del cerebro, traumatismo craneoencefálico, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, encefalopatías y enfermedades neurodegenerativas. Los métodos de la invención proporcionan una detección cualitativa o cuantitativa de ARN de mamífero extracelular en el líquido cefalorraquídeo u otro líquido corporal de un animal, más preferiblemente de un ser humano, en el que el ARN está asociado con una enfermedad o estado neurológico tal como lesión o traumatismo, o con células y tejidos del sistema nervioso central. El ARN extracelular asociado con una enfermedad neurológica y/o una lesión neurológica incluye, pero no se limita a, el ARN del gen de la presenilina 1 (PS1) mutado, ARN del gen de la presenilina 2 (PS2) mutado y ARN de Par 4 (respuesta a la apoptosis de próstata-4). Debe entenderse que esta especie de ARN proporciona ejemplos y no una limitación de la invención.

Los métodos ilustran la utilidad en enfermedades no neoplásicas y estados patológicos que afectan a otros órganos sólidos y sistemas de órganos, tales como los del sistema gastrointestinal, el sistema genitourinario, el sistema endocrino, el sistema respiratorio, el sistema musculoesquelético y la piel. En estas aplicaciones, el método ilustra la detección cualitativa o cuantitativa de ARN de mamífero extracelular en el plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal de un animal, más preferiblemente de un ser humano, en el que el ARN está asociado con un estado patológico o una enfermedad de dicho órgano o sistema de órganos y/o sus células y tejidos. Por ejemplo, puede detectarse adicionalmente ARNm de troponina T cardíaca (ARNm de TnTc) en algunos casos de enfermedad o patologías del músculo esquelético tales como distrofia muscular de Duchenne, polimiositis y miopatía inducida por enfermedad renal en fase terminal.

En ciertas realizaciones preferidas de los métodos de la invención, el ARN de mamífero asociado con células o tejido no hematológicos o no hematopoyéticos, no neoplásicos, o ADNc derivado del mismo, se amplifica de manera cuantitativa, permitiendo de ese modo la comparación cuantitativa de dicho ARN o ADNc presentes en un líquido corporal tal como plasma sanguíneo, suero o líquido cefalorraquídeo de un animal no preñado, preferiblemente un ser humano. En este caso, la cantidad de dicho ARN detectada en el líquido corporal de un animal individual particular se compara con un intervalo de cantidades de dicho ARN detectadas en dicho líquido corporal en poblaciones de animales sanos, en el que cantidades aumentadas de ARN en dicho líquido corporal del animal individual particular en comparación con los animales sanos es indicativo de una enfermedad o un estado patológico, o es un indicador predictivo de una enfermedad o un estado patológico. Las células o el tejido no hematológicos, no neoplásicos pueden ser células o tejido diferenciados de manera terminal, o células o tejido no proliferativos. En realizaciones particularmente preferidas, las células o el tejido son los del corazón, el cerebro o el músculo.

Los métodos dados a conocer en el presente documento ilustran además modos para identificar animales, más preferiblemente seres humanos, que tienen una enfermedad o estados patológicos no neoplásicos, permitiendo de ese modo que se usen opciones de tratamiento informadas, racionales para tomar decisiones terapéuticas.

Otro uso ventajoso de los métodos dados a conocer en el presente documento es ilustrar un marcador para evaluar la adecuación de la terapia, o para determinar si se requiere una terapia adicional o más avanzada o eficaz. La descripción ilustra por tanto métodos para desarrollar un pronóstico en tales pacientes.

Otro uso ventajoso para los métodos dados a conocer en el presente documento es ilustrar el examen de individuos para determinar su predisposición a una enfermedad o un estado patológico, y adicionalmente para determinar su necesidad de evaluación de diagnóstico adicional y/o de terapia preventiva.

En una realización particularmente preferida, la presente invención proporciona métodos para detectar ARNm de troponina T cardíaca o ARNm de troponina I cardíaca extracelulares y sus isoformas en sangre o fracciones sanguíneas, incluyendo plasma y suero, o en otro líquido corporal, en un ser humano. Tal como se prevé en el presente

documento, los métodos comprenden las etapas de extraer ARN de sangre, plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, amplificar *in vitro* ARNm de troponina T cardiaca o ADNc derivado del mismo, y/o amplificar *in vitro* ARNm de troponina I cardiaca o ADNc derivado del mismo, de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar el producto amplificado de ARNm o ADNc de troponina T cardiaca y/o de ARNm o ADNc de troponina I cardiaca.

5 En un primer aspecto de esta realización, la presente invención proporciona métodos para detectar ARNm de troponina T cardiaca y/o ARNm de troponina I cardiaca en sangre o fracciones sanguíneas, incluyendo plasma y suero, u otro líquido corporal en un ser humano como método para detectar, diagnosticar o monitorizar una enfermedad o un estado patológico del corazón tal como infarto de miocardio clínico o subclínico o enfermedad cardiaca isquémica o insuficiencia coronaria.

10 En una realización particularmente preferida, la presente invención proporciona un método para detectar ARNm de cadena pesada de beta-miosina extracelular en sangre o fracciones sanguíneas, incluyendo plasma y suero, o en otro líquido corporal, en un ser humano, comprendiendo el método las etapas de extraer ARN de sangre, plasma sanguíneo, suero, u otro líquido corporal, amplificar *in vitro* ARNm o ADNc de cadena pesada de beta-miosina derivado del mismo, de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar el producto amplificado de ARNm o ADNc de
15 cadena pesada de beta-miosina.

En un primer aspecto de esta realización, la presente invención proporciona métodos para detectar ARNm de cadena pesada de beta-miosina en sangre o fracciones sanguíneas, incluyendo plasma y suero, u otro líquido corporal en un ser humano como método para detectar, diagnosticar o monitorizar una enfermedad o un estado patológico del corazón tal como los asociados con lesión miocárdica.

20 En una realización particularmente preferida, la presente invención proporciona un método para detectar ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos ácido (ARNm del factor de crecimiento de unión a heparina-1) extracelular y/o ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos básico extracelular en sangre o fracciones sanguíneas, incluyendo plasma sanguíneo y suero, u otro líquido corporal, en un ser humano, comprendiendo el método las etapas de extraer
25 ARN de sangre, plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, amplificar *in vitro* ARNm o ADNc del factor de crecimiento de fibroblastos ácido derivado del mismo, y/o ARNm o ADNc del factor de crecimiento de fibroblastos básico derivado del mismo, de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar el producto amplificado de ARNm o ADNc del factor de crecimiento de fibroblastos ácido y/o ARNm o ADNc del factor de crecimiento de fibroblastos básico.

30 En un primer aspecto de esta realización, la presente invención proporciona métodos para detectar ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos ácido o ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos básico en sangre o fracciones sanguíneas, incluyendo plasma sanguíneo y suero, u otro líquido corporal en un ser humano, como método para detectar, diagnosticar o monitorizar una enfermedad o un estado patológico del músculo liso vascular, más preferiblemente aterosclerosis y/o hiperplasia de la íntima.

35 En una realización particularmente preferida, la presente invención proporciona un método para detectar ARNm de respuesta a la apoptosis de próstata-4 (Par-4) extracelular en líquido cefalorraquídeo, sangre o fracciones sanguíneas incluyendo plasma y suero, u otro líquido corporal, en un ser humano, comprendiendo el método las etapas de extraer ARN de líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero u otro líquido corporal, amplificar *in vitro* ARNm de Par-4 o ADNc derivado del mismo, de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar el producto amplificado de ARNm o ADNc de Par-4.

40 En un primer aspecto de esta realización, la presente invención proporciona métodos para detectar ARNm de Par-4 en líquido cefalorraquídeo, sangre o fracciones sanguíneas incluyendo plasma y suero, u otro líquido corporal en un ser humano como método para detectar, diagnosticar o monitorizar una enfermedad o un estado patológico o una lesión del cerebro. En un uso particularmente ventajoso de la invención, la enfermedad o el estado patológico o la lesión del cerebro es accidente cerebrovascular, isquemia del cerebro, hipoxia del cerebro, lesión cerebral traumática y/o enfermedades neurodegenerativas.

45 La descripción también ilustra kits de diagnóstico para su uso en la práctica de los métodos de la invención, específicamente para la detección, el diagnóstico, la monitorización, el pronóstico o la predicción de una enfermedad no neoplásica o una enfermedad patológica o una lesión, proporcionando el kit de diagnóstico reactivos para la extracción de ARN de mamífero de plasma, suero u otro líquido corporal, y cebadores o sondas usados en la detección del ARN extraído o ADNc derivado del mismo.

50 Realizaciones preferidas específicas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 La descripción ilustra métodos para diagnosticar, evaluar, predecir o monitorizar en un animal, más preferiblemente en un ser humano, enfermedades no neoplásicas o estados patológicos o una lesión detectando ARN de mamífero extracelular asociado con dicha enfermedad o estado patológico o lesión, tal como pero sin limitarse a ARN derivado de células o tejido no hematológicos o no hematopoyéticos, no neoplásicos; ARN de células o tejido diferenciados de manera terminal; ARN de células no proliferativas y/o ARN específico para células o tejidos de

5 órgano(s) o sistema(s) de órganos, en los que el ARN se detecta en un líquido corporal de dicho animal, preferiblemente sangre y más preferiblemente plasma sanguíneo y suero así como en otros líquidos corporales, preferiblemente líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, derrames incluyendo derrame pleural, derrame pericárdico y derrame articular, ascitis, secreciones cervicouterinas, secreciones vaginales, secreciones endometriales, secreciones gastrointestinales, esputos y secreciones bronquiales, y líquidos asociados con lavados de tejidos.

10 La descripción ilustra además un método para detectar y/o monitorizar ARN de mamífero en plasma sanguíneo, suero, y/o líquido corporal de un animal, lo más preferiblemente un ser humano, o ADNc derivado del mismo, que está asociado con células o tejido no hematológicos o no hematopoyéticos afectados por una lesión o enfermedad no neoplásica, comprendiendo el método las etapas de extraer ARN de plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, amplificar *in vitro* o amplificar la señal de una fracción del ARN extraído o ADNc derivado del mismo, de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar la señal o el producto amplificado del ARN o ADNc derivado del mismo.

15 La descripción ilustra la detección de ARN de mamífero que no contiene secuencias de ácido nucleico virales o retrovirales dentro de su propia secuencia. La descripción proporciona además la detección de ARN de mamífero que no se transcribe a partir de un sitio frágil de ADN genómico, siendo un sitio frágil un locus que es un sitio frecuente de rotura de la hebra de ADN. Por tanto, la descripción ilustra además la detección de ARN que se transcribe a partir de ADN genómico de tipo natural, además de la detección de ARN transcrito a partir de un ADN genómico mutado, deleciónado, translocado, metilado o alterado de otra forma. La descripción ilustra la detección de ARN mensajero, además de especies de ARN no mensajero tales como ARN ribosómico, ARN de transferencia, ribonucleoproteína y ARN transcrito a partir de ADN no nuclear.

20 La descripción ilustra además un método para detectar y/o monitorizar ARN de mamífero en plasma sanguíneo, suero, y/u otro líquido corporal de un animal, más preferiblemente un ser humano, o ADNc derivado del mismo, que está asociado con células o tejidos diferenciados de manera terminal no hematológicos o no hematopoyéticos, no neoplásicos o células o tejidos no proliferativos, incluyendo tejidos o bien sanos o bien enfermos, comprendiendo el método las etapas de extraer ARN de plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, amplificar *in vitro* o amplificar la señal de una fracción del ARN extraído o ADNc derivado del mismo de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar la señal o el producto amplificado de ARN o ADNc derivado del mismo, produciéndose la señal o el producto amplificado a partir de un ARNm que es específico para células o tejidos diferenciados de manera terminal no hematológicos o no hematopoyéticos, no neoplásicos o células o tejidos no proliferativos.

25 La descripción ilustra además métodos para detectar y/o monitorizar ARN de mamífero asociado con células y tejidos no hematológicos o no hematopoyéticos, no neoplásicos que son característicos de tejido(s) y/u órgano(s) y/o sistema(s) de órganos específico(s), o bien enfermos o bien sanos, comprendiendo los métodos las etapas de extraer ARN de plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, amplificar *in vitro* o amplificar la señal de una fracción del ARN extraído o ADNc derivado del mismo de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar la señal o el producto amplificado de ARN o ADNc derivado del mismo, produciéndose la señal o el producto amplificado a partir de un ARNm que es específico para células o tejidos diferenciados de manera terminal no hematológicos o no hematopoyéticos, no neoplásicos, o células o tejidos no proliferativos que son característicos de tejido(s) y/u órgano(s) y/o sistema(s) de órganos específico(s), o bien enfermos o bien sanos.

30 La descripción ilustra además métodos para detectar y/o monitorizar ARN de mamífero en sangre, plasma sanguíneo, suero y/u otro líquido corporal de un animal, más preferiblemente de un ser humano, o ADNc derivado del mismo, que se deriva de células o tejidos no neoplásicos, cuando dicho ARN produce una proteína que tiene un efecto perjudicial consiguiente sobre otras células o tejidos no neoplásicos diferentes, dando como resultado de ese modo una enfermedad o un estado patológico de las células o los tejidos o su(s) órgano(s) y sistema(s) de órganos afectados de manera perjudicial, comprendiendo el método las etapas de extraer ARN de plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, amplificar *in vitro* o amplificar la señal de una fracción del ARN extraído o ADNc derivado del mismo, de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, y detectar la señal o el producto amplificado del ARN o ADNc derivado del mismo. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para detectar dentro de un líquido corporal ARNm asociado con la producción de lipoproteínas, derivándose dicho ARNm de células del hígado, y teniendo dicha proteína un efecto perjudicial sobre las células del sistema vascular tales como las arterias, dando como resultado de ese modo aterosclerosis.

35 En los métodos, puede extraerse ARN de mamífero extracelular de un líquido corporal de un animal, más preferiblemente de un ser humano. A partir de este ARN extraído, se amplifica entonces ARNm asociado con una enfermedad no neoplásica o un estado patológico o una lesión, o derivado de células, tejidos u órganos no neoplásicos específicos del animal, o bien tras su conversión en ADNc o bien directamente, usando métodos de amplificación *in vitro* de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa, o mediante amplificación de una señal asociada con el ARNm o ADNc derivado del mismo de manera cualitativa o cuantitativa. El producto amplificado se detecta entonces de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa.

40 En aspectos adicionales, ARN de mamífero extracelular específico de órgano o específico de tejido o identificable de tejido presente en un líquido corporal, más preferiblemente plasma sanguíneo y suero, que se deriva de células o tejido no hematológicos o no hematopoyéticos, no neoplásicos de un animal, lo más preferiblemente un ser

humano, o ADNc derivado del mismo, se hibrida con un cebador, sonda, sustrato sólido o superficie de contacto bioeléctrica específicos, comprendiendo el método la extracción de ARN de un líquido corporal, más preferiblemente plasma o suero, e hibridar el ARN o ADNc derivado del mismo con un cebador, sonda, sustrato sólido o superficie de contacto bioeléctrica específicos que consiste en secuencias de oligonucleótido complementarias al ARN de células y/o tejido no hematológicos, no neoplásicos específicos, o ADNc derivado del mismo. La descripción ilustra de ese modo los productos de la hibridación.

En la práctica de los métodos, puede extraerse ARN de mamífero extracelular de cualquier líquido corporal, incluyendo pero sin limitarse a sangre completa, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, derrames incluyendo derrame pleural, derrame pericárdico y derrames articulares, ascitis, secreciones cervicouterinas, secreciones vaginales, secreciones endometriales, secreciones gastrointestinales, esputos y secreciones bronquiales, y líquidos asociados con lavados de tejidos, usando, por ejemplo, métodos de extracción descritos en la patente estadounidense de titularidad conjunta n.º 6.329.179 B1. En la práctica, puede extraerse ARN de mamífero extracelular del líquido corporal usando métodos tales como, pero sin limitarse a, método de extracción con gelatina; método de extracción con sílice, perla de vidrio o diatomeas; métodos de extracción a base de fenol-ácido-tiocianato de guanidinio; métodos de extracción a base de ácido-tiocianato de guanidinio; métodos que usan centrifugación a través gradientes de cloruro de cesio o similares; métodos de extracción a base de fenol-cloroformo; y/u otros métodos de extracción de ARN disponibles, tal como se conocen en la técnica para su uso en la extracción de ARN intracelular, incluyendo métodos de extracción de ARN disponibles comercialmente, por ejemplo, usando o adaptando o modificando los métodos de Boom *et al.* (1990 J. Clin. Microbiology 28: 495-503); Cheung *et al.* (1994 J. Clin. Microbiology 32: 2593-2597); Boom *et al.* (1991 J. Clin. Microbiology 29: 1804-1811); Chomczynski y Sacchi (1987 Analytical Biochem. 162: 156-159); Chomczynski, (1993 Biotech. 15: 532-537); Chomczynski y Mackey (1995 Biotechniques 19: 942-945); Chomczynski y Mackey (1995 Analytical Biochem. 225: 163-164); Chirgwin *et al.* (1979 Biochem. 18: 5294-5299); Fournie *et al.* (1986 Analytical Biochem. 158: 250-256); y además tal como se describe en la patente estadounidense de titularidad conjunta n.º 6.329.179 B1. Debe entenderse además que cualquier método de extracción de ARN que haya demostrado idoneidad para la extracción de ARN asociado a tumores o derivado de tumores de plasma o suero u otro líquido corporal se reconoce por el presente documento como adecuado para la extracción de ARN de mamífero no neoplásico de líquido corporal.

El método de extracción usado para la extracción de ARN de mamífero extracelular puede ser un método de extracción disponible comercialmente adecuado para la extracción de ARN intracelular, por ejemplo, TRIzol™ (Life Technologies); Trisol™ (BioTecx Laboratories); ISOGEN™ (Nippon Gene); RNA Stat™ (Tel-test); TRI Reagent™ (Sigma); sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega); minikit RNeasy (Qiagen); Perfect RNA: kit de aislamiento de ARN total (Five Prime-Three Prime Inc., Boulder, Colorado); o un kit disponible comercialmente similar, en el que la extracción del ARN puede realizarse según las instrucciones del fabricante, adaptadas al líquido corporal.

Puede extraerse ARN de un líquido corporal usando una sonda o sondas que hibridan específicamente con una especie de ARN específica, tal como pero sin limitarse a sondas unidas a sustratos sólidos o sondas unidas a partículas o perlas magnéticas, o sondas en las que tras la hibridación con un ácido nucleico, un gradiente eléctrico o gradiente magnético o gradiente de densidad puede permitir de ese modo la extracción y/o separación de especies de ARN específicas del resto del líquido corporal. Además, el ARN o ADNc derivado del mismo puede hibridarse con un sustrato sólido en una superficie de contacto bioeléctrica, tras lo cual la hibridación de un ARN específico, o ADNc derivado del mismo, genera una señal eléctrica que puede adicionalmente amplificarse y detectarse.

El líquido corporal puede ser o bien plasma sanguíneo o bien suero. Se prefiere, pero no se requiere, que la sangre se procese poco después de extraerse, y preferiblemente en el plazo de tres horas, de modo que se minimice cualquier degradación de ácido nucleico en la muestra. La sangre puede recogerse en primer lugar mediante venopunción y mantenerse en hielo hasta el procesamiento adicional. Preferiblemente, en el plazo de 30 minutos a una hora desde la extracción de la sangre, se separa el suero mediante centrifugación, por ejemplo a 1100 x g durante 10 minutos a 4°C. Cuando se usa plasma, no se deja que la sangre coagule antes de la separación de los componentes celulares y acelulares. El suero o el plasma pueden congelarse, por ejemplo a -70°C, tras la separación de la parte celular de la sangre hasta que se someta a ensayo adicionalmente, con lo cual la congelación de la muestra puede mantenerse durante periodos prolongados (por ejemplo, varios años) antes de someter a ensayo. Cuando se usa plasma o suero u otro líquido corporal congelado, el suero o plasma o líquido corporal congelado se descongela rápidamente, por ejemplo en un baño de agua a 37°C, y se extrae el ARN del mismo sin demora usando métodos tal como se describió anteriormente.

Tras la extracción de ARN de un líquido corporal de un animal, una fracción del cual contiene un ARN de mamífero asociado con una enfermedad no neoplásica o enfermedad patológica o lesión, o una fracción del cual contiene un ARN de mamífero derivado de células o tejidos de un órgano o sistema de órganos de dicho animal, incluyendo pero sin limitarse a ARN derivado de células y tejidos que no proliferan, y/o ARN derivado de células y tejidos diferenciados de manera terminal, el ARN o ADNc derivado del mismo se amplifica preferiblemente *in vitro*. Los ensayos de amplificación aplicables incluyen pero no se limitan a los ensayos de amplificación detallados en la patente estadounidense de titularidad conjunta n.º 6.329.179 e incluyen pero no se limitan a la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), la reacción en cadena de la ligasa, métodos de amplificación de señal de ADNc y ARN incluyendo amplificación de señal de cadena ramificada, indicadores de ARN amplificables, replicación mediante Q-beta, amplificación basada en transcripción, amplificación de ADN boomerang, activación por

desplazamiento de cadena, tecnología de sonda cíclica, amplificación isotérmica basada en la secuencia de ácido nucleico, otros ensayos de replicación de secuencia autosostenida y otros ensayos de amplificación de ácidos nucleicos tal como se conocen en la técnica, y/o variaciones o combinaciones de los mismos, realizados de manera o bien cualitativa o bien cuantitativa. Por ejemplo, los métodos pueden utilizar métodos de amplificación de ácidos nucleicos tal como se conocen en la técnica, tales como pero sin limitarse a adaptar los descritos por Edmands *et al.* (1994 PCR Methods Applic. 3: 317-319); Abravaya *et al.* (1995 Nucleic Acids Res. 23: 675-682); Urdea *et al.* (1993 AIDS 7 (supl. 2): S11-S14); y/o Kievits *et al.* (1991 J. Virological Methods 35: 273-286).

En los métodos, puede convertirse ARN de mamífero en ADNc usando transcriptasa inversa antes de la amplificación *in vitro* usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una muestra, tal como 10 microL de ARN extraído del suero se somete a transcripción inversa en un volumen de 30 microL que contiene 200 unidades de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (VLMM) (Promega, Madison, WI), un tampón de reacción suministrado por el fabricante, dNTP 1 mM, 0,5 microgramos de hexámeros al azar y 25 unidades de RNAsin (Promega, Madison, WI). La transcripción inversa se realiza normalmente bajo una capa de aceite mineral de recubrimiento para inhibir la evaporación y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos seguido por incubación a 37°C durante una hora. Alternativamente, pueden usarse otros métodos bien conocidos en la técnica para transcribir de manera inversa el ARN de mamífero a ADNc.

Las sondas o los cebadores de amplificación pueden ser específicos para amplificar el ARN de mamífero o ADNc derivado del mismo asociado con una enfermedad no neoplásica o un estado patológico, y/o asociado con un tejido no proliferativo y/o diferenciado de manera terminal y/o no neoplásico de un órgano o sistema de órganos. La amplificación puede realizarse mediante RT-PCR, en la que los cebadores de amplificación son específicos para amplificar el ADNc. Debe reconocerse que el diseño de dichos cebadores o sondas se basa en la secuencia de ácido nucleico del ARN o ADNc, tal como se conoce en la técnica, usando métodos tal como se conocen en la técnica, y además tal como se detallan en la patente estadounidense de titularidad conjunta n.º 6.329.179 B1.

En los métodos, tras la amplificación, el producto de amplificación del ARN o ADNc, o el producto de señal amplificada del ARN o ADNc, puede detectarse entonces de manera cualitativa o cuantitativa. En los métodos, la detección de un producto de amplificación del ARN de mamífero o ADNc derivado del mismo, o señal derivada de los mismos, se logra usando un método de detección tal como pero sin limitarse a electroforesis en gel; electroforesis capilar; ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) o modificaciones del mismo, tales como amplificación usando cebadores biotinilados o modificados de otra forma; hibridación de ácido nucleico usando sondas marcadas de manera detectable, específicas, tales como sonda marcada con fluorescencia, radioisótopos o de manera cromogénica; detección de fluorescencia inducida por láser; análisis de transferencia de tipo Northern; análisis de transferencia de tipo Southern; electroquimioluminiscencia; detección por transferencia puntual inversa; y cromatografía de líquidos de alta resolución, realizándose los métodos de detección usando métodos conocidos en la técnica.

En un ejemplo, se detecta ARNm de troponina T cardiaca en un líquido corporal, lo más preferiblemente sangre, plasma sanguíneo o suero, o en otro líquido corporal. La detección de ARNm de troponina T cardiaca en un líquido corporal es ventajosa para la detección, el diagnóstico, la monitorización, el pronóstico o la provisión de un indicador predictivo de enfermedades no neoplásicas y estados patológicos del corazón, lo más preferiblemente infarto de miocardio, lesión e infarto de miocardio subclínicos, y/o insuficiencia coronaria, incluyendo la asociada con angina y angina inestable. La amplificación puede realizarse mediante RT-PCR, preferiblemente mediante el método de Townsend *et al.* (1995 J. Mol. Cell. Cardiol. 27: 2223-2236), o Messner *et al.* (2000 Am. J. Clin. Pathol. 114: 544-549) o Ricchiuti y Apple (1999 Clin. Chem: 45: 2129-2135). Puede usarse el método expuesto por Messner *et al.* (2000 Am. J. Clin. Pathol. 114: 544-549), en el que se realiza RT-PCR anidada, en la que las secuencias de cebador de oligonucleótido preferidas usadas en las primeras reacciones de amplificación por RT-PCR son las siguientes:

Cebador 1: 5'GTTCTGAGGGAGAGCAGA (sentido; SEQ ID No. 1)

Cebador 2: 5'AAGTGGTTTCTAGACGAGGA (antisentido; SEQ ID No. 2)

y en la que las secuencias de cebador de oligonucleótido preferidas usadas en las segundas reacciones de amplificación por RT-PCR son las siguientes:

Cebador 3: 5'GACCATGTCTGACATAGAAG (sentido; SEQ ID No. 3)

Cebador 4: 5'CCGTCTCGTAGATATTGAAC (antisentido; SEQ ID No. 4)

En un ejemplo, se recoge ARNm de troponina T cardiaca de suero o plasma, por ejemplo de una alícuota de aproximadamente 1,5 mL de suero o plasma, y se extrae el ARN de la misma usando el kit de aislamiento de ARN total Perfect RNA (Five Prime-Three Prime) según las instrucciones del fabricante. A partir de esta preparación de ARN extraído, se someten entonces a transcripción inversa 10 microL para dar ADNc tal como se describió anteriormente. Se realiza la RT-PCR anidada para el ADNc de troponina T cardiaca usando el método de Messner *et al.* (2000 Am. J. Clin. Pathol. 114: 544-549), en el que se realiza PCR usando Taq ADN polimerasa y la mezcla de incubación (con MgCl₂ 1,5 mmol/L) de Appligene Oncor (Illkirch Cedex, Francia). Se utilizan los cebadores 1-4 descritos anteriormente (SEQ ID No. 1-4), añadiéndose los cebadores 1 y 2 (SEQ ID No. 1 y 2) a la mezcla para la primera fase de la reacción de PCR, y añadiéndose los cebadores 3 y 4 (SEQ ID No. 3 y 4) a la mezcla para la segunda fase de la reacción de PCR, por

ejemplo usando 10 picomoles de cada uno del cebador 1 y 2 (SEQ ID No. 1 y 2), y 10 picomoles de cada uno del cebador 3 y 4 (SEQ ID No. 3 y 4). Se amplifican las mezclas apropiadas para cada reacción de fase en un termociclador con un perfil de temperatura que consiste en 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, apareamiento a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Se logra entonces la detección del producto amplificado, por ejemplo, mediante electroforesis en gel a través de un gel de agarosa al 1,5% (agarosa de calidad para biología molecular, Gibco BRL), usando tinción con bromuro de etidio para la visualización e identificación del fragmento de producto, en el que la longitud esperada para la isoforma TnTc3 es de 733 pares de bases, y la longitud esperada para la isoforma TnTc4 es de 634 pares de bases.

La descripción ilustra también métodos alternativos de amplificación de ARNm o ADNc de troponina T cardiaca conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a los métodos de Ricchiuti y Apple (1999 Clin. Chem. 45: 2129-2135), y de Townsend *et al.* (1995 J. Mol. Cell. Cardiol 27: 2223-2236).

La descripción ilustra además la clonación de los fragmentos de producto amplificados en vectores de replicación de ADN recombinante usando técnicas convencionales, por ejemplo para la clonación de ARNm de TnTc o productos amplificados de ADNc en vectores pGEM-T tal como se describe por Townsend *et al.* (1995 J. Mol. Cell. Cardiol. 27: 2223-2236). Puede producirse ARN a partir de productos de PCR clonados, y en algunos casos el ARN expresado de ese modo, por ejemplo usando el kit de transcripción/traducción Quick Coupled (Promega, Madison, WI) tal como indica el fabricante.

La invención ilustra además la digestión con enzimas de restricción de un producto amplificado, tal como la digestión con enzimas de restricción de un producto amplificado de ARNm o ADNc de TnTc y/o producto amplificado de ARNm o ADNc de TnIc, tal como usando las enzimas de restricción *HinfI* y *MspI* (New England BioLabs, Beverly, MA), tal como se describe por Messner *et al.* (2000 Clin. Chem. 114: 544-549). Se reconocerá además que los productos amplificados pueden digerirse con enzimas de restricción antes de una segunda fase de amplificación. Los métodos de amplificación pueden realizarse también usando cebadores específicos para una secuencia control interna, tal como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o c-abl, usando métodos conocidos en la técnica.

En otro ejemplo, se detecta ARNm de troponina I cardiaca (ARNm de TnIc) en un líquido corporal, más preferiblemente sangre, plasma sanguíneo o suero, o en otro líquido corporal. La detección de ARNm de troponina I cardiaca en un líquido corporal es ventajosa para la detección, el diagnóstico, la monitorización, el pronóstico o la provisión de un indicador predictivo de enfermedades no neoplásicas y estados patológicos del corazón, lo más preferiblemente infarto de miocardio, lesión o infarto de miocardio subclínicos, y/o insuficiencia coronaria, incluyendo la asociada con angina y angina inestable. En una realización preferida, la amplificación se realiza mediante RT-PCR, preferiblemente mediante el método de Messner *et al.* (2000 Am. J. Clin. Pathol. 114: 544-549), o Ricchiuti y Apple (1999 Clin. Chem. 45: 2129-2135). En una realización preferida, se usa el método de Messner *et al.* (2000 Am. J. Clin. Pathol. 114: 544-549), en el que se realiza RT-PCR anidada, en la que las secuencias de cebador de oligonucleótido preferidas usadas en las primeras reacciones de amplificación por RT-PCR son las siguientes:

Cebador 1: 5'AACCTCGCCCTGCACCAG (sentido; SEQ ID No. 5)

Cebador 2: 5'CCCGGGACTCCTTATTTTCG (antisentido; SEQ ID No. 6)

y en la que las secuencias de cebador de oligonucleótido preferidas usadas en las segundas reacciones de amplificación por RT-PCR son las siguientes:

Cebador 3: 5'CCTCCAACCTACCGCGCTTA (sentido; SEQ ID No. 7)

Cebador 4: 5'GACTCGGAAGGACGGATGA (antisentido; SEQ ID No. 8)

En un ejemplo, se recoge ARNm de troponina I cardiaca de suero o plasma, por ejemplo de una alícuota de aproximadamente 1,5 ml de suero o plasma, y se extrae el ARN de la misma usando el kit de aislamiento de ARN total Perfect RNA (Five Prime-Three Prime) según las instrucciones del fabricante. A partir de esta preparación de ARN extraído, se someten entonces a transcripción inversa 10 microL para dar ADNc tal como se describió anteriormente. Se realiza la RT-PCR anidada para el ADNc de troponina I cardiaca usando el método de Messner *et al.* (2000 Am. J. Clin. Pathol. 114: 544-549), realizándose la PCR usando Taq ADN polimerasa y la mezcla de incubación (con MgCl₂ 1,5 mmol/l) de Appligene Oncor (Illkirch Cedex, Francia). Se utilizan los cebadores 1-4 descritos anteriormente (SEQ ID No. 5-8), añadiéndose los cebadores 1 y 2 (SEQ ID No. 5 y 6) a la mezcla para la primera fase de la reacción de PCR, y añadiéndose los cebadores 3 y 4 (SEQ ID No. 7 y 8) a la mezcla para la segunda fase de la reacción de PCR, por ejemplo usando 10 picomoles de cada uno del cebador 1 y 2 (SEQ ID No. 5 y 6), y 10 picomoles de cada uno del cebador 3 y 4 (SEQ ID No. 7 y 8). Se amplifican las mezclas apropiadas para cada reacción de fase en un termociclador con un perfil de temperatura que consiste en 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, apareamiento a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Se logra entonces la detección del producto amplificado, por ejemplo, mediante electroforesis en gel a través de un gel de agarosa al 1,5% (agarosa de calidad para biología molecular, Gibco BRL), usando tinción con bromuro de etidio para la visualización e identificación del fragmento de producto, en el que la longitud esperada para el producto de amplificación de TnIc es de 581 pares de bases.

La descripción ilustra también métodos alternativos de amplificación de ARNm o ADNc de troponina I cardiaca conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a los métodos de Ricchiuti y Apple (1999 Clin. Chem. 45: 2129-2135).

5 En otro ejemplo, se detecta ARNm de cadena pesada de beta-miosina en un líquido corporal de un animal, más preferiblemente en sangre, plasma sanguíneo, o suero o en otro líquido corporal. La detección de ARNm de cadena pesada de beta-miosina en un líquido corporal es ventajosa para la detección, el diagnóstico, la monitorización, el pronóstico o la provisión de un indicador predictivo de enfermedades no neoplásicas y estados patológicos del músculo, más ventajosamente músculo cardiaco del corazón. En un ejemplo, se recoge ARNm de cadena pesada de beta-miosina de suero o plasma, por ejemplo de una alícuota de aproximadamente 1,5 mL de suero o plasma, y se extrae ARN de la misma usando el kit de aislamiento de ARN total Perfect RNA (Five Prime-Three Prime) según las instrucciones del fabricante. A partir de esta preparación de ARN extraído, se someten entonces a transcripción inversa 10 microL para dar ADNc tal como se describió anteriormente. Se hibrida entonces el ADNc con un cebador o sonda específicos para ADNc de cadena pesada de miosina, lo más preferiblemente una sonda o un cebador de oligonucleótido, en el que el cebador o la sonda es específico para la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADNc de cadena pesada de beta-miosina. Alternativamente, el ARNm extraído puede hibridarse directamente con una sonda específica para la secuencia de nucleótidos de un fragmento del ARNm. Las sondas o los cebadores hibridados pueden permitir de ese modo la amplificación o bien cualitativa o bien cuantitativa o la amplificación de la señal del ARNm o ADNc derivado del mismo, tal como ADNc de cadena pesada de beta-miosina, seguido por la detección del producto, mediante métodos de la técnica tal como se describió anteriormente.

20 En otro ejemplo, se detecta ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos ácido y/o ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos básico en un líquido corporal, más preferiblemente sangre, plasma sanguíneo y suero, u otro líquido corporal. La detección de ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos ácido y/o ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos básico en un líquido corporal es ventajosa para la detección, el diagnóstico, la monitorización, el pronóstico o la provisión de un indicador predictivo de enfermedades no neoplásicas y estados patológicos del sistema cardiovascular, lo más preferiblemente enfermedades no neoplásicas y estados patológicos relacionados con aterosclerosis e hiperplasia de la íntima. La amplificación puede realizarse mediante RT-PCR, preferiblemente mediante el método de Zhao *et al.* (1994 Circulation 90: 677-685) aunque preferiblemente durante 45 ciclos.

30 En un ejemplo, se recoge ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos ácido y/o ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos básico de sangre, más preferiblemente de plasma sanguíneo o suero, u otro líquido corporal, por ejemplo de una alícuota de aproximadamente 1,5 mL de suero o plasma, y se extrae el ARN de la misma usando el kit de aislamiento de ARN total Perfect RNA (Five Prime-Three Prime) según las instrucciones del fabricante. A partir de esta preparación de ARN extraído, se someten entonces a transcripción inversa 10 microL para dar ADNc tal como se describió anteriormente. Se realiza la RT-PCR para el ADNc del factor de crecimiento de fibroblastos ácido y/o ADNc del factor de crecimiento de fibroblastos básico usando el método de Zhao *et al.* (1994 Circulation 90: 677-685) aunque preferiblemente durante 45 ciclos, detectándose el producto amplificado tal como se describió anteriormente, por ejemplo mediante electroforesis en gel con tinción con bromuro de etidio.

40 En otro ejemplo, se detecta ARNm de respuesta a la apoptosis de próstata-4 (Par-4) en un líquido corporal, más preferiblemente líquido cefalorraquídeo, o sangre, plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal. La detección de ARNm de Par-4 en un líquido corporal es ventajosa para la detección, el diagnóstico, la monitorización, el pronóstico o la provisión de un indicador predictivo de enfermedades no neoplásicas y estados patológicos y lesiones del cerebro y el sistema nervioso, tales como accidente cerebrovascular, isquemia del cerebro, hipoxia del cerebro, lesión cerebral traumática y enfermedad neurodegenerativa. Puede realizarse una amplificación mediante RT-PCR, preferiblemente mediante el método de Dhillon *et al.* (2001 Exp. Neurol. 170: 140-148) aunque preferiblemente durante 45 ciclos.

45 En un ejemplo, se recoge ARNm de Par-4 de líquido cefalorraquídeo o suero o plasma, por ejemplo de una alícuota de líquido cefalorraquídeo, y se extrae el ARN de la misma usando el kit de aislamiento de ARN total Perfect RNA (Five Prime-Three Prime) según las instrucciones del fabricante. A partir de esta preparación de ARN extraído, se someten entonces a transcripción inversa 10 microL para dar ADNc tal como se describió anteriormente. Se realiza la RT-PCR para ADNc de Par-4 usando el método de Dhillon *et al.* (2001 Exp. Neurol. 170: 140-148) aunque preferiblemente durante 45 ciclos, detectándose el producto amplificado tal como se describió anteriormente, por ejemplo mediante electroforesis en gel con tinción con bromuro de etidio.

50 En métodos particularmente ventajosos, se emplea un enfoque de panel multiplexado o análisis secuencial o chip de ADNc para permitir el análisis secuencial o simultáneo de ARN múltiple de una muestra de líquido corporal. En un aspecto de esta realización, se detectan de ese modo múltiples ARN de mamífero asociados con un órgano o sistema de órganos particular en un líquido corporal, más preferiblemente sangre, plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, como método para detectar, diagnosticar, monitorizar, predecir o pronosticar una enfermedad no neoplásica o un estado patológico o una lesión. En una realización particularmente ventajosa, se detectan ARNm de troponina T cardiaca y ARNm de troponina I cardiaca u otro ARN derivado del miocardio tal como ARNm de cadena pesada de beta-miosina de manera secuencial, simultánea, multiplexada o en chip a partir de la misma muestra de líquido corporal, más preferiblemente sangre, plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal.

En una realización, se compara el ARN de interés con ARN de un gen o genes de mantenimiento extraídos de manera similar del líquido corporal de manera o bien cuantitativa o bien cualitativa.

5 En otra realización, el ARN de mamífero de una muestra de líquido corporal de un animal, lo más preferiblemente un ser humano, se analiza de manera simultánea o secuencial en comparación con marcadores proteicos o marcadores lipoproteicos o marcadores de ADN de dicha muestra de líquido corporal de manera cualitativa o cuantitativa, en la que el análisis comparativo de la presencia de ARN de mamífero en dicha muestra de líquido corporal con respecto a la presencia de la proteína o el ADN en dicha muestra corporal facilita el diagnóstico, la detección, la evaluación, la monitorización, el pronóstico o la predicción de una enfermedad no neoplásica o un estado patológico o una lesión en dicho animal. Por ejemplo, puede detectarse ARN de mamífero tal como pero sin limitarse a ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos ácido y/o ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos básico y/o ARNm del factor de crecimiento derivado de las plaquetas en sangre y compararse de manera secuencial o simultánea con lipoproteínas séricas y/o colesterol sérico como método de pronóstico o predicción de la enfermedad aterosclerótica.

15 Los ejemplos de realizaciones preferidas proporcionados en el presente documento mediante los cuales se detectan ARNm de troponina T cardiaca o ARNm de troponina I cardiaca o ARNm de cadena pesada de beta-miosina o ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos ácido o ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos básico o ARNm de Par-4 en líquido corporal se proporcionan como ejemplos y no como limitaciones a los métodos de la invención. Debe entenderse que la invención abarca generalmente la detección de ARN de mamífero extracelular asociado con lesión traumática o isquémica del corazón o el cerebro humanos, en la que el ARN se detecta en un líquido corporal tomado de dicho ser humano. Se entenderá en la técnica que otro ARN puede proporcionar marcadores de dicha lesión, y está dentro del alcance y espíritu de la invención que estos ARN puedan extraerse como ARN extracelular de plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, las especies de ARN de interés o ADNc derivado del mismo puedan amplificarse o amplificarse la señal usando cebadores o sondas específicos para el ARN o ADNc de interés, y la señal o el producto amplificado detectarse, tal como se enseña por la invención en el presente documento.

25 En una realización particularmente preferida, el ARN de mamífero asociado con una enfermedad no neoplásica o un estado patológico o ADNc derivado del mismo se amplifica o se amplifica la señal en una reacción de amplificación cuantitativa. La amplificación cuantitativa del ARN o ADNc de mamífero es particularmente ventajosa cuando dicho ARN está presente a niveles inferiores en un líquido corporal de animales sanos, pero presente a niveles superiores en un líquido corporal de animales con una enfermedad o un estado patológico o una lesión. El método permite de ese modo una discriminación estadística entre individuos con una enfermedad o un estado patológico y poblaciones sanas o poblaciones sin la enfermedad o el estado patológico. El método cuantitativo permite además la comparación entre individuos que tienen la enfermedad o el estado, en los que niveles superiores de dicho ARN en un líquido corporal es indicativo de una enfermedad o un estado patológico de mayor gravedad, o de aparición más temprana. El método cuantitativo proporciona de ese modo un método para monitorizar una enfermedad o un estado patológico, o monitorizar una respuesta a la terapia para una enfermedad o un estado patológico, o para determinar un pronóstico. Los métodos de la descripción ilustran de ese modo un marcador para evaluar la adecuación de la terapia, o para determinar si se requiere terapia adicional o más avanzada. Es particularmente ventajoso realizar los métodos de la descripción en serie para monitorizar un estado o una enfermedad de un animal, y para evaluar la adecuación de la terapia o la necesidad de cambiar la terapia. Los métodos permiten además de ese modo que se usen opciones de tratamiento informadas, racionales para tomar decisiones terapéuticas.

40 Los métodos se usan de ese modo ventajosamente para proporcionar un diagnóstico o pronóstico de, o como indicador predictivo de una enfermedad no neoplásica o un estado patológico o una lesión. Los métodos son particularmente útiles para proporcionar un diagnóstico o pronóstico de, o una monitorización de, o para proporcionar un indicador predictivo de estados o enfermedades cardiovasculares. Por tanto, los métodos serán útiles en la evaluación de individuos que tienen síntomas que podrían ser el resultado de un estado o una enfermedad cardiovascular. Los métodos serán además útiles en la evaluación de individuos que tienen factores de riesgo para un estado o una enfermedad cardiovascular. Los métodos serán además útiles para la monitorización o determinación del pronóstico de individuos que se sabe que tienen un estado o una enfermedad cardiovascular. Por tanto, los métodos serán útiles o bien solos o bien conjuntamente con otras pruebas, ensayos, procedimientos o exámenes que permiten la evaluación de estados y enfermedades cardiovasculares, tales como pero sin limitarse a pruebas de esfuerzo, exploraciones radiológicas, ecocardiograma y electrocardiogramas. Los métodos serán útiles además para monitorizar un individuo durante o tras cirugía.

55 Los métodos son además particularmente útiles para proporcionar un diagnóstico o un pronóstico de, o como indicador predictivo para una enfermedad neurológica no neoplásica o una lesión o un estado patológico neurológico. Por tanto, los métodos serán útiles en la evaluación de individuos que tienen síntomas que podrían ser el resultado de una enfermedad o estado neurológico. Los métodos serán además útiles en la evaluación de individuos que tienen factores de riesgo para una enfermedad o estado neurológico. Los métodos serán además útiles para monitorizar o determinar el pronóstico de individuos que se sabe que tienen una enfermedad o estado neurológico. Por tanto, los métodos serán útiles o bien solos o bien conjuntamente con otras pruebas, ensayos, procedimientos o exámenes que permiten la evaluación de estados y enfermedades neurológicas, tales como pero sin limitarse a exámenes radiológicos tales como exploración con TAC y exploración con IRM, electroencefalograma y punción lumbar. Los métodos serán además útiles para monitorizar un individuo durante o tras cirugía.

Los métodos serán además ventajosos en el examen de individuos para determinar su predisposición a enfermedades y estados patológicos, permitiendo de ese modo la institución de una terapia preventiva.

5 Los métodos proporcionan kits de diagnóstico para la detección, el diagnóstico, la monitorización, el pronóstico o la predicción de una enfermedad no neoplásica o un estado patológico o una lesión, en los que el kit de diagnóstico proporciona la extracción de ARN de mamífero de plasma, suero u otro líquido corporal, y/o proporciona cebadores o sondas usados en la detección del ARN extraído de interés o ADNc derivado del mismo.

Los métodos y usos preferidos para los métodos de la invención se ilustran más detalladamente en el siguiente ejemplo. Este ejemplo ilustra ciertos aspectos del método descrito anteriormente y resultados ventajosos. Este ejemplo se muestra a modo de ilustración y no a modo de limitación.

10 EJEMPLO 1

15 Un hombre de 52 años de edad se presenta en su médico con quejas de aparición reciente de episodios cada vez más frecuentes de molestias torácicas leves. Su médico sospecha de una posible etiología cardíaca, y pide una evaluación cardíaca adicional. El hombre se somete a una "prueba de esfuerzo" que consiste en una prueba de electrocardiograma durante y tras ejercicio en cinta andadora controlado. Se extrae sangre venosa periférica del hombre a la hora y a las seis horas tras la prueba de esfuerzo para evaluar la presencia de ARNm de troponina T cardíaca y ARNm de troponina I cardíaca usando los métodos de la invención. Se recogen cinco ml de plasma sanguíneo durante cada periodo de tiempo, se mantienen en hielo hasta la separación del plasma de la fracción sanguínea celular y entonces se congelan hasta las pruebas adicionales. Se evalúan ambas muestras de plasma en un laboratorio al mismo tiempo descongelando rápidamente las muestras congeladas, extrayendo ARN del plasma usando un kit de extracción de ARN comercial tal como el kit de aislamiento de ARN total Perfect RNA (Five Prime-Three Prime) según las instrucciones del fabricante, sometiendo a transcripción inversa el ARN extraído para dar ADNc tal como se describió anteriormente y amplificando el ADNc con cebadores específicos para ADNc de troponina T cardíaca y ADNc de troponina I cardíaca mediante los métodos de la invención, tal como usando el método de Messner *et al.* (2000 Am. J. Clin. Pathol. 114: 544-549), realizado de manera cualitativa. Se detecta entonces el producto amplificado, tal como usando electroforesis en gel. La detección del ARNm de troponina T cardíaca y/o ARNm de troponina I cardíaca en la sangre periférica indicaría una enfermedad cardiovascular subyacente asociada con lesión celular durante la prueba de esfuerzo, y el médico en este caso haría de ese modo un diagnóstico de angina inestable y de ese modo establecería medidas terapéuticas.

30 Cinco semanas tras la prueba en cinta andadora, el paciente se presenta en el servicio de urgencias con quejas de molestias torácicas subesternales continuas y dificultad al respirar. El médico de urgencias sospecha de un posible infarto de miocardio. Para confirmar esto, extrae sangre venosa periférica del paciente y evalúa la sangre para detectar la presencia de ARNm de troponina T cardíaca y/o ARNm de troponina I cardíaca en la sangre periférica, usando los métodos de la invención descritos. La presencia de ARNm de troponina T cardíaca y ARNm de troponina I cardíaca se confirma de ese modo y se hace de ese modo un diagnóstico de infarto de miocardio, y se ingresa al hombre en la unidad de cuidados coronarios del hospital. Allí, se monitorizarían de manera cuantitativa en serie el ARNm de troponina T cardíaca y ARNm de troponina I cardíaca en sangre usando el método de la invención como medio de monitorización de la evolución del infarto de miocardio, la gravedad de la lesión del tejido miocárdico y el pronóstico para el paciente. Además, se monitoriza el ARNm de cadena pesada de beta-miosina usando el método para evaluar adicionalmente la gravedad de la lesión del tejido miocárdico.

40

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar, diagnosticar o monitorizar una lesión de un órgano en un ser humano, comprendiendo el método la etapa de detectar cualitativa o cuantitativamente ARN de humano extracelular en un líquido corporal obtenido previamente de dicho ser humano, en el que dicho ARN humano se detecta sometiendo a ensayo para detectar dicho ARN humano o ADNc derivado del mismo, de manera cualitativa o cuantitativa, en el que la lesión de un órgano es lesión traumática o isquémica del cerebro o el corazón.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la lesión traumática o isquémica del cerebro o el corazón es un accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, lesión cerebral isquémica, hipoxia del cerebro o traumatismo craneoencefálico.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el líquido corporal se selecciona de sangre, plasma sanguíneo, orina, líquido cefalorraquídeo o suero.
4. Método para detectar ARN humano extracelular en sangre, plasma sanguíneo o suero, u otro líquido corporal, todos ellos, sangre, plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal, obtenidos previamente de un ser humano, en el que dicho ARN está asociado con una lesión de un órgano de dicho ser humano, comprendiendo el método las etapas de:
 - a) extraer ARN de sangre, plasma sanguíneo, suero u otro líquido corporal de un ser humano, en el que una parte de dicho ARN extraído comprende un ARN humano extracelular asociado con una lesión de un órgano de dicho ser humano;
 - b) amplificar *in vitro* o amplificar la señal de una fracción del ARN extraído o ADNc derivado del mismo de manera cuantitativa o cualitativa usando cebadores o sondas específicos para una secuencia de ácido nucleico humana de dicho ARN humano extracelular, o ADNc derivado del mismo, para producir una señal o producto amplificado;
 - c) detectar la señal o el producto amplificado producido de ese modo,
 en el que la lesión de un órgano es lesión traumática o isquémica del cerebro o el corazón.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicho ARN humano extracelular se deriva del corazón o el cerebro de dicho ser humano.
6. Método según la reivindicación 4 ó 5, mediante el cual se detecta, diagnostica o monitoriza una lesión de un órgano.
7. Método según las reivindicaciones 4 a 6, en el que dicho órgano es el corazón o el cerebro del ser humano.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el ARN humano traduce una proteína que tiene un efecto perjudicial sobre las células o los tejidos dentro del ser humano.
9. Método de detección de ARN humano extracelular obtenido de plasma o suero de un ser humano, estando asociado dicho ARN humano con una lesión de un órgano de dicho ser humano, comprendiendo el método las etapas de:
 - a) extraer ARN de plasma sanguíneo o suero de un ser humano, en el que una parte de dicho ARN comprende un ARN humano extracelular asociado con una lesión de un órgano de dicho ser humano;
 - b) hibridar una parte de dicho ARN humano extracelular asociado con una lesión de un órgano de dicho ser humano, o ADNc derivado del mismo, con un cebador, una sonda o un sustrato sólido, en el que el cebador, la sonda o el sustrato sólido es específico para secuencias de nucleótidos humanas de dicho ARN humano extracelular, o ADNc derivado del mismo;
 - c) detectar el ADNc o ARN hibridado,
 en el que la lesión de un órgano es una lesión traumática o isquémica del cerebro o el corazón.
10. Método según la reivindicación 4 ó 9, en el que dicho ARN humano es ARNm de troponina T cardíaca, ARNm de troponina I cardíaca, ARNm de cadena pesada de beta-miosina, ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos ácido o ARNm de Par-4.
11. Método según la reivindicación 9, en el que dicho ARN humano extracelular se deriva del corazón o el cerebro.
12. Método según la reivindicación 4 ó 9, en el que dicha lesión de un órgano es una de un grupo que comprende infarto de miocardio, isquemia miocárdica, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía, accidente cerebrovascular, lesión cerebral isquémica, estados hipóxicos del cerebro y traumatismo craneoencefálico.