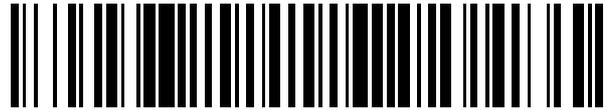


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 245**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008 E 08795523 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2195450**

54 Título: **Métodos de uso de miARN para la detección de muerte celular in vivo**

30 Prioridad:

**22.08.2007 US 965871 P**

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

**24.07.2013**

73 Titular/es:

**TROVAGENE, INC. (100.0%)  
11055 FLINTKOTE AVENUE  
SAN DIEGO, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**SHEKHTMAN, EUGENE M.;  
MELKONYAN, HOVSEP S.;  
UMANSKY, SAMUIL R. y  
SCHEINKER, VLADIMIR S.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 415 245 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 de uso de miARN para la detección de muerte celular *in vivo*

5 **Campo de la invención**

La invención proporciona métodos no invasivos para el aislamiento y la detección de pequeños ARN libres de células, en particular, microARN (miARN o miRNA por sus siglas en inglés) en secuencias de fluidos corporales seleccionados entre sangre, suero y orina. Más específicamente, la presente invención abarca métodos para detectar *in vivo* la muerte celular mediante el análisis de orina, sangre o suero para detectar los niveles de miARN para el diagnóstico clínico y el seguimiento del tratamiento.

**Antecedentes de la invención**

15 La muerte celular es un componente normal del desarrollo y el funcionamiento de los organismos multicelulares. Al ser un proceso natural, la muerte celular está implicada en la patología de numerosas enfermedades causadas por factores internos. La muerte celular también acompaña a enfermedades causadas por agentes físicos, químicos, o biológicos externos.

20 Existen dos tipos principales de muerte celular, la necrosis y la apoptosis, marcados por diferentes características morfológicas y moleculares (Kerr et al., Br. J. Cancer. 26, 239-257 (1972); Umansky, Theor. Biol. 97, 591-602 (1982); Umansky et al., Adv Pharmacol. 41, 383-407 (1997); Ameisen, Cell Death Differ. 11, 4-10 (2004); Lockshin y col. Int J Biochem Cell Biol. 36, 2405-19 (2004); Kroemer G., et al., Cell Death and Differentiation 12, 1463-1467 (2005)). Se considera que la necrosis es el fracaso metabólico catastrófico que resulta directamente del deterioro molecular y/o estructural severo y conduce a la inflamación y al deterioro secundario a las células circundantes. La apoptosis es un fenómeno biológico mucho más prevalente que la necrosis y puede ser inducida por señales específicas tales como hormonas, citoquinas, por la ausencia de señal específica, tal como factores de crecimiento o de adhesión, o por deterioro molecular que no causa la pérdida catastrófica de la integridad. La apoptosis es el resultado de una respuesta celular activa que implica la iniciación de una cascada ordenada y específica de eventos moleculares. La apoptosis conduce a la aparición de condensación y marginación de la cromatina, fragmentación nuclear, contracción celular, formación de ampollas en la membrana y fragmentación internucleosomal enzimática de ADN nuclear características (Umansky et al., Biochim Biophys Acta. 655, 9-17 (1981); Arends et al., Am J Pathol. 136, 593-608 (1990)). También se han descrito otras formas más raras de muerte celular, caracterizadas por la morfología específica, por ejemplo, la denominada muerte celular por autofagia (Bredesen et al., Stroke. 38 (Supl 2): 652-660 (2007)).

Con independencia de un mecanismo específico y del tipo de muerte celular, los métodos para detectar tipos de células que están muriendo son importantes para el diagnóstico de diversas enfermedades, críticos para la enfermedad y el seguimiento del tratamiento, y útiles para el diagnóstico diferencial. Además, los métodos capaces de detección de muerte celular específica *in vivo* son útiles para el desarrollo de fármacos destinados a la prevención o la inducción de la muerte celular, así como para el análisis de la citotoxicidad de los fármacos recientemente desarrollados.

45 Existen algunas pruebas clínicas para el diagnóstico de la muerte celular excesiva relacionada con la enfermedad basadas en la detección de marcadores específicos de tejido, tales como, por ejemplo, antígenos, enzimas y otras proteínas en la sangre o en otros fluidos corporales. La medición de la actividad de las enzimas específicas del hígado en la sangre, por ejemplo, es un método ampliamente utilizado para la evaluación de la muerte de hepatocitos (Amacher, et al., Regul Toxicol Pharmacol. Abril, 27 (2):119-130 (1988); Salaspuro, et al., Enzyme. 37 :87-107 (1987); Herlong, Hosp. Pract. (Off Ed) 29 (11):32-38 (1994)). La evaluación del nivel de antígenos específicos de cardiomiocitos también se ha utilizado para el diagnóstico del infarto de miocardio (Mair et al., Clin Lab Med. Chem. 37:1077-1084 (1999); Nunes et al., Rev Port Cardiol. 20:785-788 (2001)). Sin embargo, el número de tales técnicas se limita a enfermedades en las que se conocen un marcador y un método de detección para el análisis para proporcionar resultados específicos de tejido significativos. (Oh S et al., Curr Gastroenterol Rep. 3:12-18 (2001); Rochling et al., Clin Cornerstone. 3(6):1-12 (2001)). Otros métodos requieren una biopsia invasiva de tejidos específicos de los que se sospecha que tienen una situación de enfermedad para obtener una muestra para su análisis. Sin embargo, una biopsia de algunos órganos y tejidos, por ejemplo, el cerebro es altamente invasiva y a menudo difícil de realizar.

60 Es bien sabido que la apoptosis, o muerte celular programada, que es una forma importante de muerte celular en el organismo mamífero, está acompañada por la fragmentación internucleosómica de ADN nuclear. Muchos laboratorios han demostrado que una parte de este ADN aparece en la sangre (Lo YM Ann NY Acad Sci. 945: 1-7 (2001); Lichtenstein et al., Ann NY Acad Sci. 945:239-249 (2001); Taback et al., Curr Opin Mol Ther. 6:273-278 (2004); Bischoff et al., Hum Reprod Update. 8:493-500, (2002)). También se ha demostrado que este ADN fragmentado, llamado ADN transrenal (Tr-ADN) cruza la barrera renal y puede detectarse en la orina. (Botezatu et

al., Clin Chem. 46:1078-1084, (2000); Su et al., J. Mol Diagn. 6:101-107 (2004); Su et al., Ann NY Acad Sci. 1022:81-89 (2004).

5 Su, Y. et al., (2003) Annals of the New York Academy of Sciences vol. 3<sup>o</sup> págs. 81-89 describe que una pequeña porción de ADN de células apoptóticas escapa a la degradación completa, aparece en la sangre en forma de fragmentos de tamaño oligonucleosomal, se excreta en la orina, y se puede utilizar con fines diagnósticos.

10 Swarup V. et al., (2007) FEBS Letters vol. 581, núm. 5 págs. 795-799, describen cómo se ha informado de que el aumento de los niveles de ácidos nucleicos circulantes en plasma (libres de células) en algunos trastornos clínicos, y sugieren que esto podría proporcionar una herramienta no invasiva para la detección precoz de varias enfermedades humanas.

15 Aunque tanto el ADN de plasma libre de células y el Tr-ADN se pueden usar como herramientas de diagnóstico, éstos proporcionan un enfoque bastante limitado en la evaluación de los eventos específicos de tejido, tales como la muerte celular. Por lo tanto los métodos de análisis que son no invasivos, y ofrecen una gama más amplia de indicaciones de la patología específica, debido a su capacidad para detectar los niveles de las células que mueren en los tejidos y órganos concretos, serían útiles para el diagnóstico y el seguimiento del estado de diversas enfermedades o afecciones patológicas en los pacientes. Además, los métodos analíticos específicos de tejido que proporcionan los medios para el seguimiento de la respuesta de un paciente a una terapia de la enfermedad serían  
20 útiles para determinar la eficacia de la terapia, y en el caso de tratamiento con fármacos, la dosificación óptima requerida para la administración del fármaco.

25 Para hacer frente a estos problemas, la presente invención se centra en el uso de micro ARN (miARN) como una herramienta de diagnóstico para controlar la muerte celular *in vivo* en fluidos corporales, tales como, por ejemplo, suero y orina. A diferencia del ADN de plasma libre de células y del Tr-ADN, muchos miARN exhiben perfiles de expresión específicos de células, tejidos y órganos (Liang et al, Genomics, 8: 166 (2007); Lukiw et al, Neuroreport. 18:297-300 (2007); Lagos-Quintana et al, Curr Biol. 12:735-739 (2002); Chen y col., Nat. Genet. 38:228-233 (2006); Beuvink et al, J. Nucleic Acids Res. 35:e52 (2007)). Por otra parte, se ha demostrado la correlación de los perfiles específicos de miARN de células y tejidos con diferentes patologías y tipos de tumores (Visone R., et al Oncogene. 26:7590-7595 (2007); Nelson et al, Neuropathol Exp. Neurol. 66:461-468 (2007); Negrini et al, J Cell Sci. 120:1833-1840 (2007); Chang et al, Annu Rev. Genómica Hum Genet. 8:215-239 (2007); Jay et al, Cell Biol. 26:293-300 (2007)).

35 Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para medir *in vivo* la muerte celular mediante la detección de miARN específicos de tejido, característicos de una patología específica, en fluidos corporales, seleccionados entre sangre, suero y orina. Los presentes métodos basados en la detección de miARN en los fluidos corporales se utilizan para el desarrollo ulterior de pruebas de diagnóstico o de seguimiento.

#### 40 Compendio de la invención

45 La presente invención se refiere a un método novedoso para detectar y medir *in vivo* la muerte celular mediante el análisis de los niveles de secuencias de miARN específicas en los ácidos nucleicos libres de células obtenidos a partir de fluidos corporales seleccionados entre sangre, suero y orina, originándose dicho miARN a partir de células que mueren en todo el cuerpo, y el uso de los resultados analíticos obtenidos para determinar el estado de una enfermedad o afección médica anormal en un paciente.

50 Los métodos de la presente invención se basan en la adsorción de los ácidos nucleicos libres de células sobre, y la elución de, intercambiadores aniónicos, lo que hace posible concentrar y aislar fragmentos ácido nucleico mayores de 10 nucleótidos. Específicamente, la presente invención demuestra: (i) la presencia de miARN en dichos fluidos corporales; (ii) la detección en la orina de miARN que se originó a partir de órganos situados fuera del sistema urinario, lo que significa que han cruzado la barrera renal, tales como, por ejemplo, miARN transrenal (Tr-miARN), (iii) la detección de miARN en el suero (iv) la patología asociada con la muerte celular en una célula, tejido y/u órgano concreto está acompañada de cambios en los niveles de miARN específico para dicho órgano.

55 La presente invención proporciona un método de detección y cuantificación de miARN libres de células específicos de tejidos y/u órganos en dichos fluidos corporales para la evaluación de muerte celular *in vivo* en diferentes tejidos y órganos, en donde la muerte celular *in vivo* se asocia con un trastorno de un tejido particular y/u órgano que comprende la obtención de una muestra de fluido corporal de un sujeto; y el análisis de dicha muestra de fluido corporal para determinar una o más secuencias específicas de miARN, en donde dicho análisis comprende la etapa  
60 de detección de dicho miARN con un cebador y/o una sonda que es sustancialmente complementaria a una parte de dichas secuencias de miARN específicas. En algunas realizaciones de la presente invención, la muerte celular *in vivo* excesiva o insuficiente se asocia con un trastorno de un tejido concreto.

En una realización de la presente invención, el fluido corporal es orina. En otra realización, el presente método de análisis de una muestra de orina incluye una técnica seleccionada del grupo que consiste de la hibridación, reacción con sonda por ciclos, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, PCR para analizar polimorfismos de conformación de cadena individuales y reacción en cadena de la ligasa. En otra realización más, se reduce la degradación del ácido nucleico en dicha muestra de orina.

El método de la presente invención incluye la reducción de la degradación de ácido nucleico que comprende la inhibición de la actividad de la nucleasa mediante la adición de uno o varios inhibidores de ARNasa, la inactivación por calor, o mediante el tratamiento de dicha muestra de orina con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: guanidina-HCl, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina, y dodecilsulfato de sodio. En una realización de la presente invención, la muestra de orina se ha mantenido en la vejiga menos de 12 horas.

En una realización de la presente invención, el fluido corporal es suero. El método de la presente invención incluye el análisis de una muestra de suero incluyendo una técnica seleccionada del grupo que consiste de la hibridación, reacción con sonda por ciclos, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, PCR para analizar polimorfismos de conformación de cadena individuales y reacción en cadena de la ligasa.

En otra realización más, el método de la presente invención implica la detección de miARN libres de células, como marcador específico para el trastorno específico asociado con la muerte celular excesiva o insuficiente en un tejido u órgano. Opcionalmente, dicho trastorno es una infección patógena. Preferiblemente, dicho patógeno es un virus. Más preferiblemente, dicho virus es un virus de Epstein-Barr. Opcionalmente, dicho trastorno es un infarto cerebral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, asociado con el embarazo y/o el feto o síndrome de Down.

La presente invención proporciona un método de detección en orina miARN libres de células, procedentes de diferentes órganos y tejidos, incluidas las zonas distintas del sistema urinario, en un sujeto como resultado de un trastorno asociado con la muerte celular excesiva o insuficiente en un tejido u órgano, que comprende la obtención de una muestra de orina de un sujeto; y el análisis de dicha muestra de orina para detectar una o más secuencias específicas de miARN en donde dicho análisis comprende la etapa de detección de dicho miARN con un cebador y/o sonda que es sustancialmente complementaria a una parte de dichas secuencias de miARN específicas.

El método de la presente invención proporciona un método de seguimiento de la enfermedad y/o del tratamiento en un sujeto mediante el análisis cuantitativo de miARN libres de células específicos en un fluido corporal, seleccionado entre sangre, suero y orina que comprende la obtención periódica de una muestra de fluido corporal de un sujeto; y el análisis de dicha muestra para determinar una o más secuencias específicas de miARN que son específicas/expresadas en exceso en células, tejidos u órganos de interés, en donde dicho análisis comprende la etapa de detección de dicho miARN con cebadores y/o sonda que es sustancialmente complementaria a una parte de dichas secuencias específicas de miARN. En una realización, el fluido corporal es orina. En otra realización, el fluido corporal es suero.

#### **Breve descripción de los dibujos**

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción más concreta de las realizaciones de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos. Los dibujos no son necesarios a escala, poniéndose de relieve en cambio la ilustración de los principios de la invención.

La Figura 1 es una fotografía de una electroforesis en gel de poliacrilamida de los ácidos nucleicos extraídos de la orina filtrada utilizando Q-Sepharose™.

La Figura 2 es una fotografía de un análisis en gel de poliacrilamida de un producto de RT-PCR específico de miARN de BART1 derivado de EBV.

Las Figuras 3A a 3G son representaciones mediante diagramas de puntos de las concentraciones normalizadas de miARN en muestras de orina de pacientes en los puntos temporales de 12 y 24 horas después de un accidente cerebrovascular.

La Figura 4 es un diagrama que representa la correlación entre los cambios en las concentraciones de miARN 129 y 219 y los resultados accidente cerebrovascular. Los pacientes clasificados como ○ y □ mejoran su estado clínico un mes después del accidente cerebrovascular, y el estado clínico del paciente marcado x se ha deteriorado un mes después de una apoplejía.

La Figura 5 es una representación mediante un diagrama de puntos de las concentraciones normalizadas de miARN en muestras de orina sin filtrar de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer y controles de edad similar.

La Figura 6 es una representación mediante un diagrama de puntos de las concentraciones normalizadas de miARN en muestras de orina filtradas de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer y controles de edad similar.

La Figura 7 es una representación mediante un diagrama de puntos de las concentraciones normalizadas de miARN en muestras de suero de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y controles de edad similar.

La Figura 8 es una representación mediante un diagrama de puntos de las concentraciones normalizadas de miARN en muestras de orina de pacientes con enfermedad de Parkinson y controles de edad similar.

La Figura 9 es una representación mediante un diagrama de puntos de la concentración normalizada de miARN-9 en muestras de orina de mujeres embarazadas con síndrome de Down y fetos normales.

5

#### Descripción detallada de la invención

La tecnología de esta invención se basa en el descubrimiento de que pequeños ARN, en particular micro ARN (miARN), incluyendo miARN transrenal (Tr-miARN), se presentan en los fluidos corporales y sus concentraciones reflejan la muerte celular asociada con el deterioro de órganos u otra patología. La presencia de estas secuencias de ácidos nucleicos a niveles más bajos o más altos que el de un grupo de control es por lo tanto una indicación de que es probable que se presente una anomalía o condición patológica en el paciente del cual se obtuvo la muestra.

10

Los métodos de la presente invención ofrecen mejoras respecto a los métodos de diagnóstico, detección y seguimiento anteriores, debido a su naturaleza inherentemente no invasiva.

15

Para facilitar la comprensión de la invención, se definen a continuación varios términos:

El término "cebador" hace referencia a un oligonucleótido que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca bajo condiciones en las que se inicia la extensión del cebador. Un "cebador" oligonucleotídico puede ser producido naturalmente, en forma de un producto de digestión de enzimas de restricción purificado o ser producido sintéticamente.

20

Un cebador se selecciona para que sea "sustancialmente" complementario a una cadena de secuencia específica del molde. Un cebador debe ser suficientemente complementario para hibridar con una hebra molde para que se produzca la elongación del cebador. No se necesita que la secuencia de cebador refleje la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario puede anclarse al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador sustancialmente complementaria a la cadena. Se pueden intercalar bases no complementarias o secuencias más largas en el cebador, siempre que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia del molde para hibridar y de ese modo formar un complejo de molde-cebador para la síntesis del producto de extensión del cebador.

25

30

Una "diana" de ácido nucleico es una secuencia de miARN que se va a evaluar mediante hibridación, amplificación o cualquier otro medio de análisis de una secuencia de ácido nucleico, incluyendo una combinación de métodos de análisis.

35

Los métodos de "hibridación" implican la hibridación de una secuencia complementaria al ácido nucleico diana (la secuencia que se va a analizar). La capacidad de dos polímeros de ácido nucleico que contiene secuencias complementarias para encontrarse y reconocerse a través de la interacción de emparejamiento de bases es un fenómeno bien reconocido. Las observaciones iniciales del proceso de "hibridación" por Marmur y Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:453 (1960) y Doty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:461 (1960) han sido seguidos por el refinamiento de este procedimiento en una herramienta esencial de la biología moderna. La hibridación abarca, pero no se limita a, técnicas de hibridación mediante transferencia en ranura y puntiforme.

40

Es importante para algunas aplicaciones de diagnóstico determinar si la hibridación representa complementariedad completa o parcial. Por ejemplo, cuando se desea detectar simplemente la presencia o ausencia de miARN patógeno, sólo es importante que el método de hibridación garantice la hibridación cuando la secuencia relevante esté presente; se pueden seleccionar las condiciones en las que hibridarán las sondas parcialmente complementarias y las sondas completamente complementarias. Otras aplicaciones diagnósticas, sin embargo, pueden requerir que el método de hibridación distinga entre complementariedad parcial y completa. Puede tener interés para detectar polimorfismos genéticos.

45

50

El término "sonda" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), sea de origen natural como en forma de un producto de digestión mediante enzimas de restricción purificado o producido sintéticamente, que forma una estructura dúplex u otro complejo con una secuencia de otro ácido nucleico, debido a la complementariedad u otro medio de interacción atractiva reproducible, de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en el otro ácido nucleico. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias génicas concretas. Se contempla que cualquier sonda utilizada en la presente invención se pueda marcar con cualquier "molécula informadora", de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo, pero no limitado a, enzima (p. ej., ELISA, así como análisis histoquímicos basados en enzima), sistemas fluorescentes, radiactivos, y luminiscentes. Se contempla adicionalmente que el oligonucleótido de interés (es decir, que se va a detectar) se pueda marcar con una molécula informadora. También se contempla que se puedan marcar tanto la sonda como el oligonucleótido de interés. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema o etiqueta de detección.

55

60

5 Según se utiliza en la presente memoria, el término "miARN" es una subclase de pequeños ARN de cadena sencilla no codificantes, de aproximadamente 18-23 nucleótidos de longitud, que juega un papel importante en la regulación de procesos metabólicos, en particular debido a su participación en la regulación de la estabilidad y la traducción del ARNm que codifica proteínas específicas. El miARN también participa en otros procesos importantes, como la formación de heterocromatina y el reordenamiento del genoma.

10 Los términos muerte celular *in vivo* "excesiva" e "insuficiente" describe la situación en la que el número de células que mueren en un órgano o tejido concreto es respectivamente mayor o menor que en controles de edad similar y sexo.

10 Según se utiliza en la presente memoria, los términos "purificar", "descontaminar" y "esterilizar" se refieren a la eliminación de contaminantes de una muestra.

15 Según se utiliza en la presente memoria, los términos "purificado sustancialmente " y "aislado sustancialmente" hacen referencia a secuencias de ácidos nucleicos que se retiran de su entorno natural, aisladas o separadas, y están preferiblemente libres en 60%, más preferiblemente libres en 75%, y lo más preferiblemente libres en 90% de otros componentes con los que están asociados naturalmente. Por tanto, un "polinucleótido aislado" es un polinucleótido purificado sustancialmente. Se contempla que para llevar a la práctica los métodos de la presente invención los polinucleótidos pueden estar, pero no necesita que estén purificados sustancialmente. Una variedad de métodos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos en forma no purificada son conocidos en la técnica.

20 Según se utiliza en la presente memoria, los términos "producto de PCR" y "producto de amplificación" hacen referencia a la mezcla resultante de compuestos después de completar dos o más ciclos de las etapas de PCR de desnaturalización, recocido y extensión. Estos términos abarcan el caso en el que ha habido amplificación de uno o más segmentos de una o más secuencias diana.

25 El término "tracto urinario" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a los órganos y conductos que participan en la secreción y eliminación de la orina del cuerpo.

30 "Paciente" o "sujeto" como términos utilizados en la presente memoria, hacen referencia al receptor del tratamiento. Se incluyen pacientes mamíferos y no mamíferos. En una realización específica, el paciente es un mamífero, tal como un ser humano, cánido, múrdo, férido, bóvido, óvido, suido, o cáprido. En una realización concreta, el paciente es un ser humano.

35 En una realización de la presente invención, los miARN detectados se originan a partir de y se expresan específicamente en un tipo específico de célula, tejido, u órgano en el cuerpo, en donde las alteraciones en el nivel de dichos miARN son indicativas de patologías agudas de dicho tejido, tal como por ejemplo, infarto agudo de miocardio asociado con la muerte de los cardiomiocitos; infarto cerebral asociado con la muerte de las neuronas y las células gliales; hepatitis o cirrosis hepática asociada con la muerte de hepatocitos causada por una infección viral u otro tipo de infección o por la acción de agentes tóxicos; pancreatitis aguda asociada con la muerte de diferentes células pancreáticas; rechazo de un órgano trasplantado asociado con la muerte celular excesiva en el órgano trasplantado; daño traumático de varios órganos; numerosas infecciones agudas, por ejemplo, la tuberculosis asociada con la muerte celular en los pulmones y/o en otros órganos infectados.

45 En otra realización de la presente invención, los miARN detectados se originan a partir de y se expresan específicamente en un tipo de célula, tejido, u órgano específicos en el cuerpo, en donde las alteraciones en el nivel de dichos miARN son indicativas de patologías crónicas de dicho tejido, tales como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la demencia frontotemporal y otras enfermedades del sistema nervioso central que están causadas o acompañadas de la muerte neuronal; insuficiencia cardíaca crónica asociada con la muerte de los cardiomiocitos, enfisema asociado con la muerte de las células pulmonares; diabetes tipo I asociada con la muerte de las células beta pancreáticas, glomerulonefritis asociada con la muerte de las células de los riñones, afecciones precancerosas asociadas con la muerte apoptótica de las células precancerosas que proliferan activamente, cánceres asociados con la muerte celular por necrosis masiva debida a un suministro insuficiente de sangre, y muerte celular en órganos o tejidos infectados de forma crónica.

55 En otra realización más de la presente invención, los miARN detectados se originan a partir de y se expresan específicamente en un tipo específico de célula, tejido, u órgano en el cuerpo, y las alteraciones en el nivel de dichos miARN son indicativas de los efectos citotóxicos de agentes físicos y químicos, tales como por ejemplo la radiación asociada con dosis relativamente bajas que matan las células de médula ósea, dosis más altas que conducen a la muerte de las células epiteliales del sistema gastrointestinal, y dosis aún más altas que destruyen las neuronas del cerebro; y citotoxicidad química, asociada con la muerte celular en diferentes órganos y tejidos inducida por compuestos tóxicos naturales o sintéticos.

60

5 En otra realización más de la presente invención, los miARN detectados se originan a partir de y se expresan específicamente en un tipo específico de célula, tejido, u órgano en el cuerpo y se pueden utilizar para el pronóstico de la evolución de la enfermedad. Los cambios en los niveles de los respectivos miARN, que son indicativos de progresión/regresión de la enfermedad, éxito de la intervención terapéutica o quirúrgica, se utilizan para el seguimiento de la enfermedad y del tratamiento.

En otra realización de la invención, los miARN detectados se originan a partir de células trasplantadas, tejidos, u órganos y sus niveles son indicativos de los episodios de rechazo y el tratamiento correspondiente.

10 En otra realización de la invención, los miARN detectados se originan a partir de un agente patógeno y se utilizan para el diagnóstico y el seguimiento de la infección. En una realización específica de la presente invención, el agente patógeno es un virus, por ejemplo el virus de Epstein-Barr.

15 En otra realización más de la invención, los miARN detectados se originan a partir de células de un órgano infectado y se pueden utilizar para el apoyo diagnóstico, la evaluación de daños en los tejidos infectados y, adicionalmente el seguimiento de la enfermedad y del tratamiento.

20 En otra realización más de la invención, los miARN detectados se originan en el feto de una mujer embarazada, y son característicos de una afección o patología del feto, tales como por ejemplo pre-eclampsia, que está caracterizada por la muerte excesiva de trofoblasto en la placenta. En otra realización más, los miARN detectados se originan a partir de un feto de una mujer embarazada, y son característicos de una afección o patología del feto, tales como por ejemplo el síndrome de Down y otras trisomías acompañadas por el retraso de desarrollo de órganos y la muerte celular excesiva o inhibida.

25 En otra realización más de la invención, la información acerca de los niveles de miARN específicos de tejido o de la célula por sí solos o combinados con otros marcadores se utilizan para el diagnóstico o seguimiento de las afecciones cancerosas y precancerosas, tales como, por ejemplo, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y otros cánceres conocidos.

30 En algunas realizaciones, los niveles de miARN específicos células y/o tejidos se normalizan utilizando los niveles de miARN ubicuos en el suero, los niveles de albúmina o de creatinina en la orina, o los niveles de los miARN específicos de placenta para la normalización de otros miARN fetales específicos de tejido.

35 En un aspecto de la invención, la etapa de análisis de dicha muestra de orina para detectar miARN específicos incluye una técnica seleccionada del grupo que consiste en la hibridación, reacción con sonda por ciclos, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, PCR para analizar polimorfismos de conformación de cadena sencilla y reacción en cadena de la ligasa.

40 En ciertos aspectos de la invención, la degradación del ácido nucleico en dicha muestra de orina se reduce. El método de reducción de la degradación de ácido nucleico comprende la inhibición de la actividad nucleasa mediante el uso de inhibidores de la ARNasa, o mediante tratamiento de dicha muestra de orina con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: guanidina-HCl, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina, y dodecilsulfato de sodio. En otro aspecto de la invención, dicha muestra de orina se ha mantenido en la vejiga menos de 12 horas.

45 En una realización de la presente invención, las secuencias de miARN medidas están relacionadas específicamente con los tejidos en el cuerpo, que se pueden seleccionar entre, pero no se limitan a, pulmón, corazón, hígado, sistema nervioso, cerebro, sangre, riñón, hueso, ojo o páncreas.

50 Los tejidos seleccionados para el análisis pueden ser normales o anormales (por ejemplo, malignos). Los tejidos y tumores malignos incluyen carcinomas, sarcomas, melanomas y leucemia en general y más específicamente seleccionados a partir de tejidos y tumores malignos asociados con el cáncer del tracto biliar, el carcinoma de células de vejiga, el cáncer de hueso, el cáncer de cerebro y SNC, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el coriocarcinoma, la leucemia mielógena crónica, el cáncer de colon, el cáncer de tejido conectivo, la leucemia cutánea de células T, el cáncer endometrial, el cáncer de esófago, el cáncer de ojo, el linfoma folicular, el cáncer gástrico, la leucemia de células pilosas, el linfoma de Hodgkin, las neoplasias intraepiteliales, el cáncer de laringe, los linfomas, el cáncer de hígado, el cáncer de pulmón (p. ej., de células pequeñas y de células no pequeñas), el melanoma, el mieloma múltiple, el neuroblastoma, el cáncer de cavidad oral, el cáncer de ovario, el cáncer de páncreas, el cáncer de próstata, el cáncer de recto, el carcinoma de células renales, los sarcomas, el cáncer de piel, el carcinoma de células escamosas, el cáncer testicular, el cáncer de tiroides, y el cáncer renal. El método se puede utilizar para distinguir entre tumores benignos y malignos.

Los sujetos de los que se pueden recolectar las muestras de tejido incluyen los que están en riesgo de desarrollar un cáncer. Un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer es aquel que tiene una alta probabilidad de desarrollar cáncer

(p. ej., una probabilidad que es mayor que la probabilidad entre el público en general). Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, cuya presencia se ha demostrado que tiene una relación correlativa a una probabilidad de desarrollar un cáncer que es mayor que la probabilidad para el público en general, y sujetos expuestos a agentes causantes de cáncer (es decir, carcinógenos) tales como el tabaco, el amianto, u otras toxinas químicas, o un sujeto que previamente ha sido tratado contra el cáncer y está en remisión aparente.

Los presentes métodos incluyen el aislamiento de miARN a partir de fluidos corporales de los pacientes en donde se puede detectar un miARN de interés en un fluido corporal seleccionado de sangre, plasma, suero, y orina. En un aspecto de la presente invención, el miARN se detecta en la orina. En otra realización, el miARN se detecta en el suero.

El presente método de aislamiento de miARN de la presente invención puede utilizar materiales de intercambio aniónico disponibles en el mercado. Se pueden emplear intercambiadores de aniones fuertes o débiles. Mediante la utilización de disoluciones seleccionadas para su adsorción y elución, el miARN se puede purificar, concentrar, y aislar sustancialmente.

Mediante el empleo de una disolución a la fuerza iónica conocida para la unión inicial de miARN a los materiales de la columna de intercambio aniónico, la mayor parte de los componentes solubles en agua incluyendo otras moléculas electronegativas, tales como proteínas (contaminantes débilmente unidos) se puede lavar a través de la columna. Para la elución, la fuerza iónica requerida se alcanza mediante el uso de concentraciones conocidas de una sal tal como NaCl, que se puede mezclar con un tampón para controlar el pH, idealmente correspondiente a la fuerza iónica más baja a la que los ácidos nucleicos eluirán completamente. Las sustancias contaminantes unidas a la resina de intercambio aniónico con mayor rigor que los ácidos nucleicos pueden de ese modo quedar dentro de la columna, es decir, los contaminantes unidos más fuertemente se separan de los ácidos nucleicos.

Un intercambiador débil preferido es uno en el que, los grupos amino primarios, secundarios, o terciarios (es decir, aminas protonables) proporcionan sitios de intercambio. El intercambiador de aniones de base fuerte tiene grupos amonio cuaternario (es decir, no protonable y siempre cargado positivamente) como sitios de intercambio. Ambos intercambiadores se seleccionan en relación a sus respectivas fuerzas iónicas de adsorción y de elución y/o pH para el miARN que se esté separando. Las fuerzas de disolución son más grandes que las fuerzas de unión.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para el aislamiento de miARN transrenal de la orina, comprendiendo el método proporcionar la orina de un sujeto; opcionalmente separan las células y restos celulares de la orina por filtración o centrifugación; añadir EDTA y Tris-HCl a la orina, añadir una resina de intercambio aniónico libre de sílice a la orina, incubar la mezcla, eliminar el medio de intercambio aniónico de la orina, y eluir el miARN de la resina.

En una realización del método de aislamiento de miARN de la orina, la concentración de EDTA y Tris-HCl después de añadirlos a la orina se encuentra en un intervalo de 10-100 mM, y el pH de la disolución se encuentra entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,5.

En una realización adicional, el fluido corporal se filtra opcionalmente a través de una membrana antes de la adsorción sobre el medio de intercambio aniónico.

En una realización adicional, el medio de intercambio aniónico es una resina con una base de sefarosa funcionalizada con grupos amonio cuaternario catiónicos. Los ejemplos de las resinas basadas en sefarosa, funcionalizadas con grupos amonio catiónicos incluyen Q-Sepharose™ ANX-Sepharose™ 4 Fast Flow, DEAE-Sepharose™, y Q-Sepharose-XL™ DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare).

En una realización adicional, el medio de intercambio aniónico se selecciona a partir de un medio de intercambio aniónico de amonio cuaternario basado en sefarosa tal como Q-filters o Q-resin.

En una realización adicional de la invención, el medio de intercambio aniónico se inmoviliza sobre un soporte individualizado en el que dicho portador es una columna, cartucho o sistema de filtración portátil que se puede utilizar para el transporte o el almacenamiento del complejo unido a medio/nucleoproteína.

En otra realización de la presente invención, el análisis periódico de secuencias de miARN presentes, por ejemplo, en las muestras de orina de la misma persona puede proporcionar información acerca de principios de un proceso patológico en un órgano o tejido en concreto. Por ejemplo, el miARN122 se sintetiza únicamente en el hígado y sus aumentos de cantidad pueden ser un marcador de la hepatitis u otra patología del hígado. El síndrome de Alzheimer puede ir acompañado de aumentos en la concentración de miARN expresado específicamente en las neuronas.

En otra realización, el seguimiento más detallado del miARN específico de tejido en la muestra de fluido corporal del paciente será útil para la estimación de la gravedad de la enfermedad y para la evaluación de la eficacia de los esfuerzos terapéuticos.

- 5 En otra realización más, los datos sobre el miARN específico de tejido combinados con el análisis de las mutaciones específicas del tumor pueden ayudar a la determinación de la localización del tumor.

Otros aspectos de la presente invención se refieren a enfermedades causadas por o acompañadas de cambios en la expresión de los miARN específicos. La tecnología descrita ayudará en el diagnóstico de este tipo de patologías.

- 10 En otra realización más, la aplicación de la presente método se puede extender al seguimiento de la farmacocinética del siARN sintético en la orina del paciente para mejorar la optimización del diseño de fármacos con siARN.

- 15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos, y los ejemplos descritos en la presente memoria son únicamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

### Ejemplos

- 25 Los ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las diversas realizaciones de la invención. No se debe interpretar de ninguna manera que estos ejemplos limitan el alcance de la invención expuesta en las reivindicaciones adjuntas.

#### Ejemplo 1

- 30 Extracción de miARN de la orina:

- Recolección de orina:* Para estos experimentos, las muestras de orina de pacientes o voluntarios se recogieron en un recipiente para la recolección de orina de 110 ml estéril y se añadió inmediatamente un suplemento de EDTA hasta una concentración final entre 10 y 150 mM, preferiblemente 50 mM. Las muestras se almacenaron en alícuotas de 10 - 50 ml a -80°C. La filtración opcional de la orina se llevó a cabo en Stericup™ (Millipore, Sistema de Filtración Impulsada a Vacío, filtro Durapore™ de 0,45 µ) inmediatamente después de la recogida de la muestra antes de añadir el EDTA.

- 40 *Unión Q:* En un tubo de 50 ml se diluyeron 20 ml de orina con un volumen igual de EDTA 50 mM (pH 8,0) y Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) al que luego se añadió un suplemento de 1-2 ml de suspensión de Q-Sepharose™ (GE Healthcare; 17-0510-10) y se mezclaron rigurosamente 10 - 30 min a temperatura ambiente. La resina, con los ácidos nucleicos unidos, se recogió mediante centrifugación a 2000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrifugadora clínica de sobremesa usando un rotor de cubeta oscilante. Todo menos ~ 500 µl de sobrenadante se eliminó por aspiración. El sedimento de resina se resuspendió en el sobrenadante restante y se transfirió a una Columna de Cromatografía Micro Bio-Spin (Bio-Rad) o equivalente, que se hizo funcionar, mediante centrifugación o a vacío. La resina en la columna se lavó tres veces con 500 µl de 2 x SSC (NaCl 300 mM/citrato de sodio 30 mM (pH 7,0)) o con un tampón de fuerza iónica comparable (*p. ej.*, NaCl o LiCl 300 mM). Los ácidos nucleicos pueden hacerse eluir de la Q-Sepharose con alta fuerza iónica (*p. ej.*, NaCl o LiCl 1M), pero los métodos descritos a continuación conservan mejor el ARN.

- 50 *Elución de Q-Sepharose™ y Separación de Fases de TRIzol™:* Los ácidos nucleicos unidos se hicieron eluir adicionalmente con 500 µl de reactivo TRIzol™ (Invitrogen). La extracción de ácidos nucleicos del TRIzol se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, para la fase de separación al producto eluido de TRIzol se le añadió un suplemento de 100 µl de cloroformo, se mezcló vigorosamente, se incubó a temperatura ambiente durante 3 - 5 minutos y se centrifugó a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. Mientras se evitaba tocar la interfase, se transfirieron 300 µl de la fase superior a un tubo de centrifuga de nueva aportación. A continuación, los ácidos nucleicos se precipitaron o se limpiaron y se desalaron adicionalmente en una columna de sílice.

- 60 *Precipitación del ácido nucleico:* Para la precipitación del ácido nucleico, a la preparación descrita anteriormente se añadió un suplemento de 1 µl de glucógeno de 20 mg/ml (Roche) y 300 µl de alcohol isopropílico del 100%. Los ácidos nucleicos se recogieron mediante centrifugación, el sedimento se lavó dos veces con 200 µl de etanol al 70%, se dejó secar al aire durante 5 min a temperatura ambiente, y a continuación los ácidos nucleicos se disolvieron en 30 µl de EDTA 0,1 mM /1x ARN Secure (Ambion). Las muestras se incubaron a 60°C durante 10 min para inactivar cualquier actividad ARNasa residual.

*Limpieza de la columna sílice de ácidos nucleicos:* Para la unión a una columna de sílice (columnas limpias de PCR de Qiagen o equivalentes) se añadieron 3 volúmenes de etanol del 96% a la preparación de ácido nucleico de la fase superior de TRIzol, y, después de 3 minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se cargó en la columna. La columna se lavó dos veces con 500 µl de LiCl 2 M/etanol del 80% y dos veces con 500 µl de etanol del 80%. Los ácidos nucleicos se eluyeron con 50 µl de EDTA 0,1 mM/1x ARN Secure (Ambion). Las muestras se incubaron a 60°C durante 10 min para inactivar cualquier ARNasa residual.

*Digestión con ADNasa I y ARNasa A:* Para verificar la identidad del ácido nucleico del material extraído de la orina con el protocolo descrito anteriormente, la presente preparación se sometió a digestión con ADNasa I y/o ARNasa A. La digestión ADNasa I se llevó a cabo en el Tampón de Reacción de ADNasa I (NEB) que contenía 2 unidades de ADNasa I libre de ARNasa (NEB). La digestión con ARNasa A se llevó a cabo en tampón TE con un suplemento de 50 ng/ml de ARNasa A hervida. Las muestras se incubaron a 37°C durante 60 min y después de la adición de las muestras de colorante de carga se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% 1x TBE y se tiñeron con SYBR<sup>®</sup> Gold diluido 1/10000 (Invitrogen). Como se muestra en la Figura 1, el material aislado representa ácidos nucleicos de bajo peso molecular, principalmente ARN y sus fragmentos. Además, (véase la Figura 1), para la comparación los ácidos nucleicos de la resina Q se hicieron eluir con NaCl 3 M, calles 2 y 3, y Trizol<sup>™</sup>, calles 4 y 5.

En la Figura 1, las calles 1 y 5, representan los ácidos nucleicos aislados con altas concentraciones de sal y elución con TriZol de Q-Sepharose, respectivamente; las calles 2 y 6; 3 y 7; 4 y 8, representan los ácidos nucleicos después del tratamiento con ADNasa, ARNasa, o ADNasa más ARNasa, respectivamente.

Asimismo, para demostrar la existencia y el tamaño molecular del ARN, las alícuotas de ARN de los ácidos nucleicos purificados se digirieron con ADNasa I, calles 3 y 5.

#### Extracción de ARN del suero

Para estos experimentos, se añadieron 1,2 ml de TRIzol LS a 0,4 ml de suero, y la mezcla se centrifugó 10 a 14.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 ml, se añadieron 0,3 ml de cloroformo, y la mezcla se sacudió durante 15 segundos. Después de la centrifugación a 14.000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo de 5 ml y se añadió etanol hasta una concentración final de 70%. La mezcla se cargó en una columna Quiagen Quick en un colector de vacío, y la columna se lavó dos veces con 0,5 ml de LiCl 2M-EtOH del 80%, una vez con 0,5 ml de etanol del 80%-acetato de sodio 80 mM (pH 5,0), y finalmente con 0,5 ml de etanol del 95%. La columna se centrifugó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml durante 3 min a 14.000 rpm, y el ARN se hizo eluir con 40 µl de H<sub>2</sub>O.

#### Ejemplo2

Este Ejemplo demuestra que el miARN, de células que están muriendo, cruza la barrera renal y puede detectarse en la orina de un paciente.

#### Detección de moléculas de miARN humano en la orina

Las especies de micro ARN que se analizaron en este ejemplo se pueden agrupar en tres tipos distintos, a saber miARN ubicuos, que se expresan en todos o en múltiples tejidos, miARN específicos de tejido, y miARN en los que la expresión se altera significativamente en un tejido o tipo celular concreto. Como se muestra en la Tabla 1, se obtuvieron 20 miARN diferentes de orina de 16 voluntarios sanos y de donantes inscritos y posteriormente se detectaron mediante RT-PCR en tiempo real utilizando un kit de análisis de expresión de miARN asequible comercialmente (ABI). Los correspondientes oligonucleótidos de miARN sintéticos se utilizaron como patrones. Las reacciones se llevaron a cabo estrictamente según lo recomendado por el proveedor.

Tabla 1. miARN Detectado

SEC NO:	ID	Identificación	Secuencia	Expresión
1		hsa-miR-127	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	Expresado en exceso en cerebro
2		hsa-miR-153	UUGCAUAGUCACAAAAGUGA	Expresado en exceso en cerebro
3		hsa-miR-129	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC	Específico de cerebro
4		hsa-miR-137	UAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	Expresado en exceso en cerebro
5		hsa-miR-218	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	Ubicuo, Expresado en exceso en
6		hsa-miR-219	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU	Específico de cerebro

SEC NO:	ID	Identificación	Secuencia	Expresión
7		hsa-miR-128a	UCACAGUGAACCGGUCUCUUUU	Específico de cerebro
8		hsa-miR-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	Expresado en exceso en cerebro
9		hsa-miR-138	AGCUGGUGUUGUGAAUC	Cerebro, tiroides
10		hsa-miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGGG	Cerebro y varios otros tejidos
11		hsa-miR-124a	UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA	Específico de cerebro
12		hsa-miR-122a	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU	Específico de hígado
13		hsa-miR-133a	UUGGUCCCUUCAACCAGCUGU	Expresado en exceso en corazón y músculo
14		hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA	Expresado en exceso en corazón y músculo
15		hsa-miR-335	UCAAGAGCAAUACGAAAAAUGU	Ubicuo
16		hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUUUGGCG	Ubicuo
17		hsa-miR-215	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC	Expresado en exceso en intestino delgado y colon
18		hsa-miR-135b	UAUGGCUUUUCAUUCUAUGUG	Expresado en exceso en placenta
19		hsa-miR-517C	AUCGUGCAUCCUUUAGAGUGU	Expresado en exceso en placenta
20		hsa-miR-518e	AAAGCGCUUCCCUUCAGAGUGU	Placenta-Expresado en exceso en da

Se detectaron los tres tipos de miARN en la mayoría de preparaciones de ARN de la orina. Los números de copias más altos fueron característicos del miARN ubicuo. Sin embargo, también fueron detectables el miARN específico de tejido o el miARN expresado en exceso en un tejido o tipo celular concreto. Se ha demostrado de manera inequívoca que una porción de miARN de las células que mueren no se degrada, pero aparece en el torrente sanguíneo y finalmente se excreta en la orina.

### Ejemplo 3

- 10 El Ejemplo demuestra que el miARN de células de carcinoma nasofaríngeo humano (NPC) pueden cruzar la barrera renal del paciente y puede ser detectado en la orina del paciente mediante RT-PCR en tiempo real.

### miARN derivado de virus en la orina

- 15 Se sabe que algunos virus también codifican y producen miARN. Dado que el virus de Epstein-Barr (EBV) está involucrado en el desarrollo del carcinoma nasofaríngeo (NPC), se utilizó el presente sistema para averiguar si el miARN viral de células NPC puede llegar a la orina de un paciente y ser detectado allí. Se recogieron y se almacenaron muestras de orina de pacientes con NPC de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 de esta solicitud. La infección por EBV se confirmó mediante la detección de secuencias de ADN específicas del virus en la orina. La orina recolectada de donantes sanos fue negativa para secuencias de ADN específicas de VEB.
- 20 En este estudio se analizaron dos miARN específicos de VEB BART3-3p y BART1-3p:

BART3-3P	CGC ACC ACU AGU CAC CAG GUG U	SEC ID NO: 21
BART1-3P	UAG CAC CGC UAU CCA CUA UGU CU	SEC ID NO: 22

- 25 La transcripción inversa se llevó a cabo en 15µ l, la décima parte de la reacción de RT se sometió a amplificación por PCR usando ADN polimerasa JumpStart de Sigma. Se utilizaron los siguientes cebadores a 500 nM de concentración:

Identificación	Secuencia	SEC ID NO:
BART3-3PRT	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CAC CT	23
BART1-3PRT	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA GAC AT	24
BART3-3PF	CGC CGC ACC ACT AGT CAC	25

Identificación	Secuencia	SEC ID NO:
BART1-3PF	CGC TAG CAC CGC TAT CCA	26
miARNCR	GTG CAG GGT CCG AGG T	27

Los productos se analizaron en gel de poliacrilamida al 15% (PAAG).

Como se demuestra en la Figura 2, se detectaron ambas especies de miARN BART3 y BART1 en la orina de pacientes con NPC, pero no en la muestra de orina de un donante sano. Estos datos indican de nuevo que el miARN de células que mueren situadas fuera de sistema urinario se puede detectar en la orina. En la Figura 2, la calle 1, representa los marcadores; las calles 2 y 3, representan pacientes con carcinoma nasofaríngeo, las calles 4 y 5, representan los pacientes de control, y la calle 6, representa el control positivo, que representa los respectivos miARN sintéticos.

#### Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra que la muerte neuronal causada por un accidente cerebrovascular se puede registrar *in vivo* mediante mediciones de las concentraciones de miARN específico de las neuronas en la orina del paciente.

#### Diagnóstico de infarto cerebral

Para estos experimentos, se investigaron pacientes con infarto cerebral mediante el análisis de los cambios en las concentraciones de miARN o miARN específico del cerebro que están expresados en exceso en el cerebro, después del accidente cerebrovascular. Dado que actualmente no se sabe en qué tipos de células cerebrales y en qué áreas cerebrales se expresan estos miARN, se estudiaron 9 miARN específicos del cerebro diferentes.

*Pacientes:* Las muestras de orina se recogieron de pacientes admitidos en los hospitales a través de la sala de emergencias. El diagnóstico de infarto cerebral se basó en los síntomas clínicos. Las muestras de orina se recogieron a las 12 y 24 horas después del accidente cerebrovascular. Las muestras de orina de control fueron donadas por voluntarios de edad similar pero sin síntomas de accidente cerebrovascular. Las muestras se recogieron y se almacenaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 de esta solicitud.

*Especie de miARN:* El miARN de la orina se extrajo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Una cantidad de ARN equivalente a la aislada a partir de 675 µl de orina se sometió a PCR de transcripción inversa y 1/10 de la mezcla de RT-PCR se sometieron a PCR en tiempo real final, que se llevó a cabo utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante. Los datos obtenidos se normalizaron para las tasas de filtración de los riñones individuales mediante el nuevo cálculo de la concentración de creatinina en la orina. Para estos experimentos, se utilizaron muestras de orina recogidas de donantes sanos del mismo grupo de edad como referencia. Las diferentes especies de miARN se presentan de la siguiente manera:

1. A. hsa-miR-128a
2. B. hsa-mir-9
3. C. hsa-mir-127
4. D. hsa-mir-137
5. E. hsa-mir-129
6. F. hsa-mir-219
7. G. hsa-mir-218

Los resultados resumidos en las Figuras 3A a 3G demuestran claramente que después de un infarto cerebral, hay un aumento significativo en los niveles de varios miARN específicos de cerebro (128a, 129, 218, 219) lo que refleja la cinética de la muerte de células cerebrales.

#### Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra que la cinética de las concentraciones de miARN en la orina de los paciente después del accidente cerebrovascular proporciona información sobre resultado de la enfermedad.

#### Seguimiento del infarto cerebral

Para los experimentos, se investigaron pacientes con infarto cerebral para el análisis de correlación entre los cambios en las concentraciones de miARN específico del cerebro y el desarrollo de la enfermedad.

*Pacientes:* Se recogieron muestras de orina de pacientes admitidos en los hospitales a través de la sala de emergencias. El diagnóstico de infarto cerebral se basó en los síntomas clínicos y el MRI. Las muestras de orina se recogieron a las 12, 24, 48 horas y una semana después del accidente cerebrovascular. El estado clínico del paciente se evaluó 30 días después del accidente cerebrovascular. Las muestras de orina de control fueron donadas por voluntarios de edad similar pero sin síntomas de accidente cerebrovascular. Las muestras se recogieron y se almacenaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 de esta solicitud.

*Especie de miARN:* El miARN de la orina se extrajo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 y se analizó con los análisis de miARN TaqMan (Applied Biosystems). Una cantidad de ARN equivalente a la aislada a partir de 400 µl de orina se sometió a PCR de transcripción inversa y 1/10 de la mezcla de RT-PCR se sometió a PCR en tiempo real final, que se llevó a cabo utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante. Los datos obtenidos se normalizaron para las tasas de filtración de los riñones individuales mediante nuevo cálculo de la concentración de creatinina en la orina. Para estos experimentos, las muestras de orina recogidas de los donantes sanos del mismo grupo de edad se utilizaron como referencia.

Los resultados resumidos en las Figuras 4A y B demuestran claramente que la dinámica de los cambios en Tr-miARN 129 y Tr-miARN 219 después del infarto cerebral son diferentes en diferentes pacientes y se correlacionan con el desarrollo de la enfermedad. El aumento en la muerte neuronal a la semana después del accidente cerebrovascular en el paciente Núm. 3 corresponde a un empeoramiento en el estado clínico del paciente. Al mismo tiempo dos pacientes, cuyo miARN transrenal específico de neuronas tenía una tendencia a la normalización, demostraron una mejoría significativa.

#### Ejemplo 6

#### Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurológica progresiva que está causada por la muerte de las neuronas, particularmente en el córtex y el hipocampo. El diagnóstico se basa en el examen neurológico y la exclusión de otras causas de demencia, mientras que el diagnóstico definitivo solo se puede realizar en la autopsia. La presente invención demuestra que el exceso de muerte neuronal que caracteriza la enfermedad de Alzheimer se puede controlar mediante la medición de los niveles de los miARN específicos del cerebro aislados de la orina del paciente.

Para estos experimentos, se investigaron pacientes diagnosticados de enfermedad de Alzheimer para el análisis de los cambios en las concentraciones de miARN específico de cerebro o expresado en exceso como resultado de la muerte neuronal.

*Pacientes:* Se recogieron muestras de orina y suero de pacientes diagnosticados de diversos estadios de la enfermedad de Alzheimer. Las muestras de orina y de suero de control fueron donadas por voluntarios de edad similar pero sin síntomas de enfermedad de Alzheimer. Las muestras se recogieron y se almacenaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 de esta solicitud. Algunas muestras de orina se filtraron después de la recogida como se describe en el Ejemplo 1 para eliminar células y restos celulares.

*Especie de miARN:* El ARN de la orina y del suero se extrajo de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1.

En un grupo de experimentos una cantidad de ARN equivalente a la aislada de 750 µl de orina se sometió a PCR de transcripción inversa y 1/10 de la mezcla de RT-PCR se sometió a PCR en tiempo real final, que se llevó a cabo utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante (Applied Biosystems). Los datos obtenidos se normalizaron para las tasas de filtración de los riñones individuales mediante nuevo cálculo de la concentración de creatinina en la orina. La Figura 5 demuestra claramente que las concentraciones de varios miARN específicos del cerebro se incrementa en la orina de los pacientes de Alzheimer.

En otra grupo de experimentos, se analizó el ARN aislado de orina filtrada o del suero. Una cantidad de ARN equivalente a la aislada a partir de 0,6 ml de orina o de 50 µl de suero se sometió a PCR de transcripción inversa y 1/10 de la mezcla de RT-PCR se sometió a PCR en tiempo real final, que se llevó a cabo utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante (Applied Biosystems). Los datos obtenidos para el miARN de la orina se normalizaron para las tasas de filtración de los riñones individuales mediante nuevo cálculo de la concentración de creatinina en la orina. Los datos obtenidos para el miARN de plasma se normalizaron para el miARN-16 ubicuo. Las Figuras 6 y 7 muestran que los niveles de algunos miARN específicos de las neuronas son más altos en la orina filtrada y el suero de los pacientes de Alzheimer en comparación con los controles de edad similar.

Ejemplo 7

Enfermedad de Parkinson

5 La enfermedad de Parkinson es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central que a menudo deteriora las habilidades motoras y el habla del enfermo. La presente invención demuestra que la muerte celular excesiva de las neuronas dopaminérgicas, que caracteriza a la enfermedad de Parkinson puede ser controlada mediante la medición de los niveles de miARN específicos del cerebro aislados a partir de la orina del paciente.

10 Para estos experimentos, los pacientes diagnosticados con Parkinson se investigaron para el análisis de los cambios en las concentraciones de miARN específico del cerebro o miARN expresado en exceso como resultado de la muerte neuronal.

15 *Pacientes:* Se recogieron muestras de orina de pacientes diagnosticados con diversos estadios de la enfermedad de Parkinson. Las muestras de orina de control fueron donadas por voluntarios de edad similar sin síntomas de la enfermedad de Parkinson. Las muestras se recogieron y se almacenaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 de esta solicitud.

20 *Especie de miARN:* Para estos experimentos, el ARN de la orina se extrajo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La cantidad de ARN equivalente a la aislada a partir de 750 µl de orina se sometió a PCR de transcripción inversa y 1/10 de la mezcla de RT-PCR se sometió a PCR en tiempo real final, que se llevó a cabo utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante (Applied Biosystems). Los datos obtenidos se normalizaron para las tasas de filtración de los riñones individuales mediante nuevo cálculo de la concentración de creatinina en la orina. La Figura 8 demuestra que las concentraciones de varios miARN específicos del cerebro se incrementa en la  
25 orina de los pacientes con la enfermedad de Parkinson.

Ejemplo 8

Pruebas prenatales para las enfermedades relacionados con el embarazo o fetales

30 El principal hallazgo de la permeabilidad de la barrera renal para las moléculas de miARN abre el camino para el uso de la orina materna para realizar el diagnóstico prenatal completamente no invasivo de enfermedades congénitas. Se puede realizar dicho escrutinio no invasivo de la siguiente manera.

35 En primer lugar, se obtiene una muestra de orina de una paciente embarazada. Cuando se desea, se aísla, purifica y/o trata a continuación el miARN de la muestra de orina para evitar su degradación mediante los métodos descritos anteriormente. A continuación se realizan los perfiles de miARN, utilizando la PCR cuantitativa o una matriz de miARN y los datos obtenidos se utilizan para determinar diferentes patologías fetales, como se ha descrito más arriba para otras patologías.

40

Ejemplo 9

Síndrome de Down

45 Para los experimentos, se investigaron las diferencias en las concentraciones de miARN específico de cerebro en la orina materna entre mujeres embarazadas con fetos normales y con síndrome de Down.

50 *Pacientes:* Las muestras de orina se recogieron de mujeres embarazadas diagnosticadas de síndrome de Down mediante amniocentesis. Las muestras de orina de control fueron donadas por mujeres de edad similar con embarazos normales. Las muestras se recogieron y se almacenaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 de esta solicitud.

55 *Especies de miARN:* El miARN de la orina se extrajo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Una cantidad de ARN equivalente a la aislada a partir de 750 µl de orina se sometió a PCR de transcripción inversa y 1/10 de la mezcla de RT-PCR se sometió a PCR en tiempo real final, que se llevó a cabo utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante. Los datos obtenidos se normalizaron para el miARN 518 específico de placenta. La Figura 9 muestra la menor concentración del miARNA 9 específico de cerebro en la orina de mujeres embarazadas con fetos con síndrome de Down en comparación con la orina de mujeres con embarazos normales, lo que indica una muerte celular insuficiente en comparación con los controles respectivos.

60

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de detección y cuantificación de miARN libres de células específicos de células, tejido y/u órganos en el fluido corporal para la evaluación de la muerte celular *in vivo* en diferentes tejidos y órganos, en donde la muerte celular *in vivo* está asociada con un trastorno de un tejido y/u órgano concreto que comprende:  
 el análisis de una muestra de fluido corporal seleccionada entre sangre, suero y orina obtenida de un sujeto para determinar una o más secuencias específicas de miARN, en donde dicho análisis comprende la etapa de detectar dicho miARN con un cebador y/o sonda que es sustancialmente complementario a una parte de dichas secuencias de miARN específicas.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la muerte celular *in vivo* excesiva o insuficiente está asociada con un trastorno de un tejido concreto.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de análisis de una muestra incluye una técnica seleccionada del grupo que consiste de hibridación, reacción con sonda por ciclos, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, PCR para analizar polimorfismos de conformación de cadenas individuales y reacción en cadena de la ligasa.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en donde se reduce la degradación del ácido nucleico en una muestra de orina.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en donde la reducción de la degradación del ácido nucleico comprende la inhibición de la actividad nucleasa mediante la adición uno o varios inhibidores de ARNasa, la inactivación por calor, o mediante el tratamiento de dicha muestra de orina con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: guanidina-HCl, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina, y dodecilsulfato de sodio.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en donde una muestra de orina obtenida se ha mantenido en la vejiga menos de 12 horas.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, en donde dicho trastorno es  
 (a) una infección por patógeno, preferiblemente en donde dicho patógeno es un virus, y más preferiblemente en donde dicho virus es un virus de Epstein-Barr,  
 (b) un infarto cerebral,  
 (c) la enfermedad de Alzheimer,  
 (d) la enfermedad de Parkinson, o  
 (e) asociado con el embarazo y/o patología fetal, opcionalmente en donde dicho trastorno fetal es el síndrome de Down.
- 40 8. Un método de detección miARN libres de células en orina, que se originan de zonas distintas de sistema urinario, en un sujeto como resultado de un trastorno asociado con la muerte celular excesiva en un tejido u órgano, que comprende:  
 el análisis de una muestra de orina obtenida de un sujeto para determinar una o más secuencias específicas de miARN en donde dicho análisis comprende la etapa de detectar dicho miARN con un cebador y/o sonda que es sustancialmente complementario a una parte de dichas secuencias de miARN específicas.
- 45 9. Un método para el seguimiento de una enfermedad y/o tratamiento en un sujeto, en donde la enfermedad es un trastorno asociado con la muerte celular excesiva o insuficiente en un tejido u órgano, mediante análisis cuantitativo de los miARN libres de células específicas en un fluido corporal, que comprende:  
 el análisis de muestras de fluido corporal seleccionadas entre sangre, suero y orina, obtenida dicha muestra periódicamente de un sujeto para determinar una o más secuencias específicas de miARN que son específicos de/expresados en exceso en las células, tejido u órgano de interés, en donde dicho análisis comprende la etapa de detectar dichos miARN con cebadores y/o sondas que son sustancialmente complementaria a una parte de dichas secuencias de miARN específicas.
- 50

Figura 1

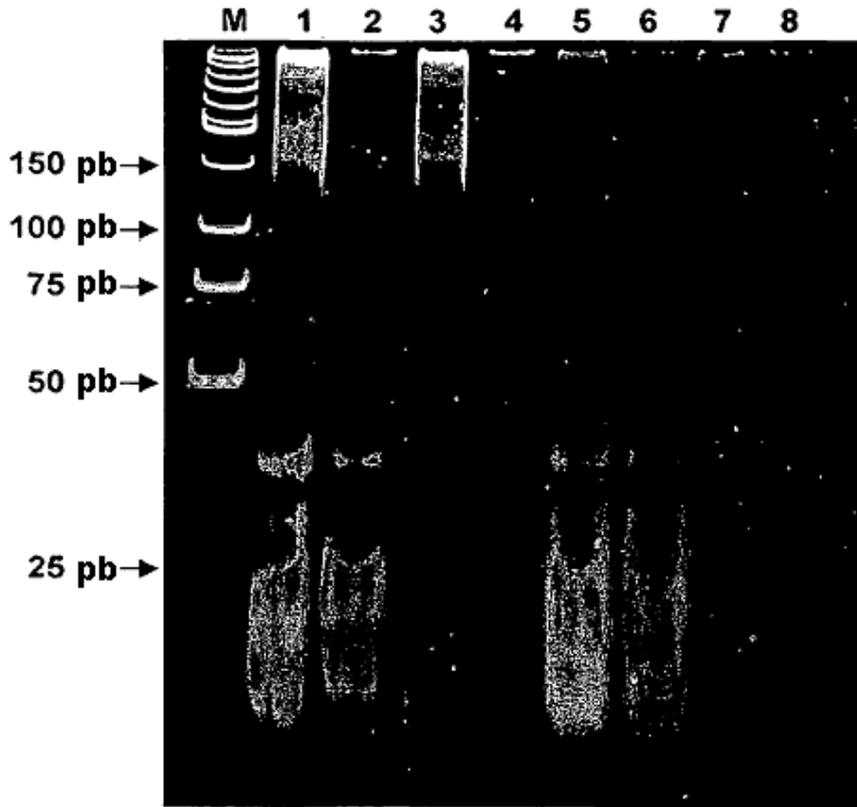
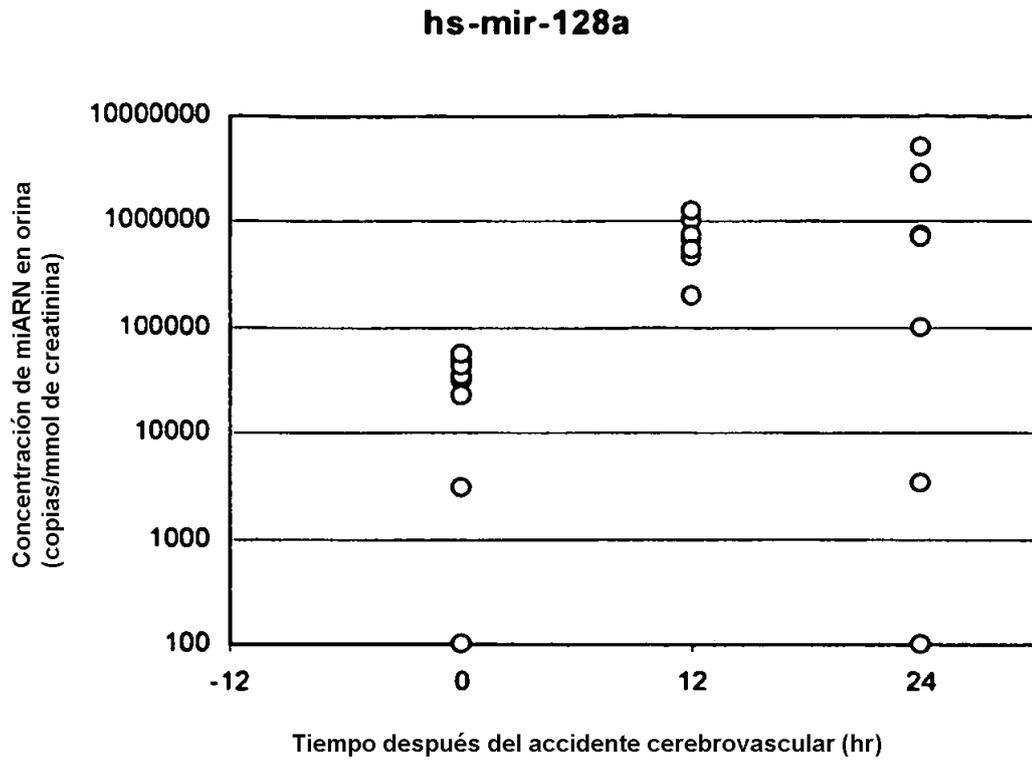


Figura 2

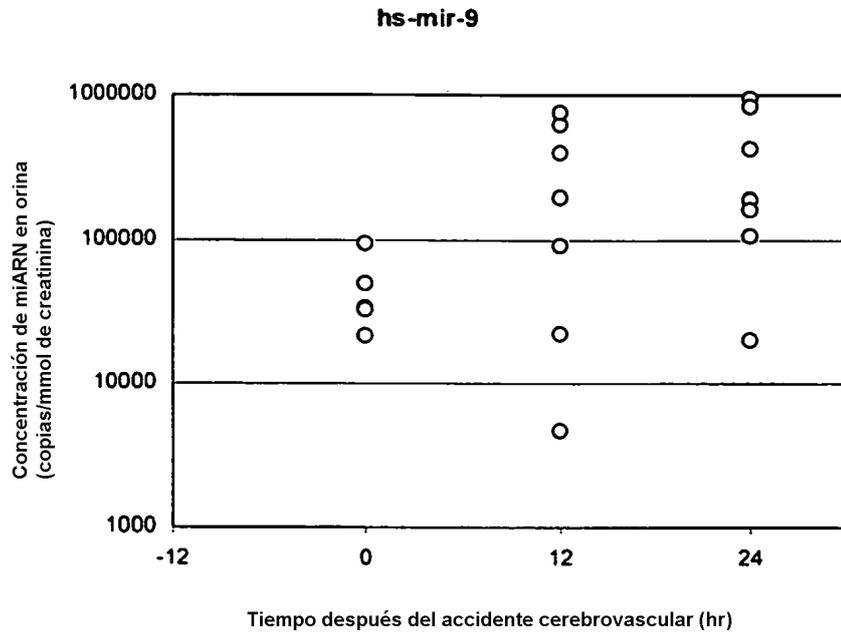


Figura 3

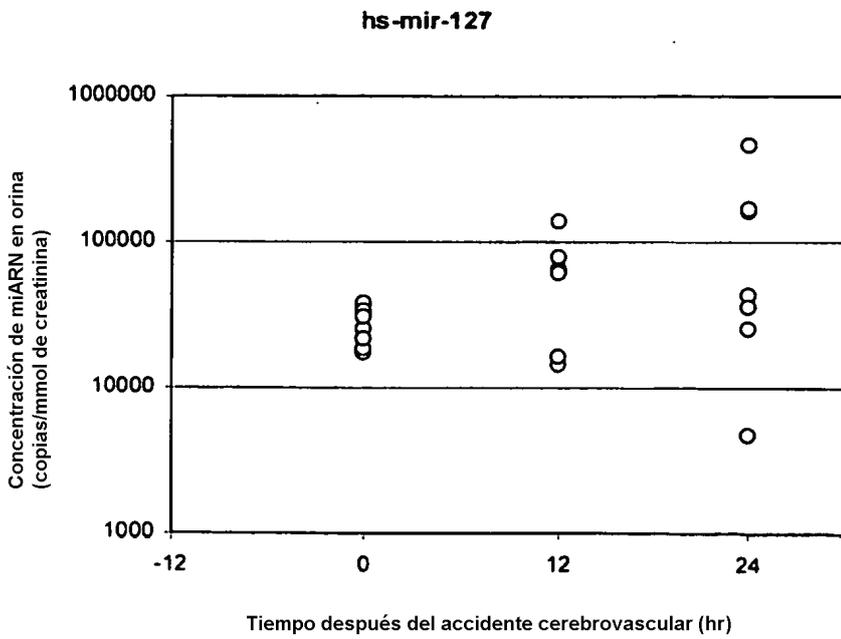
A



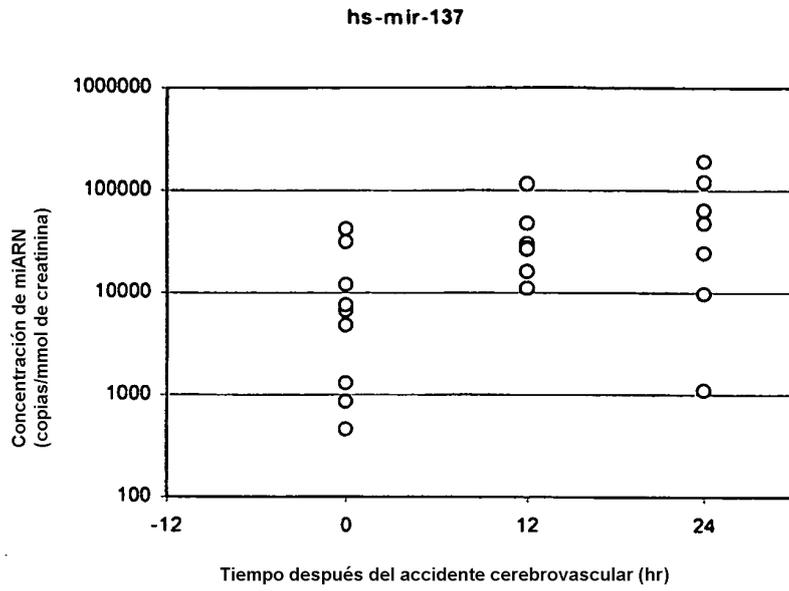
**B**



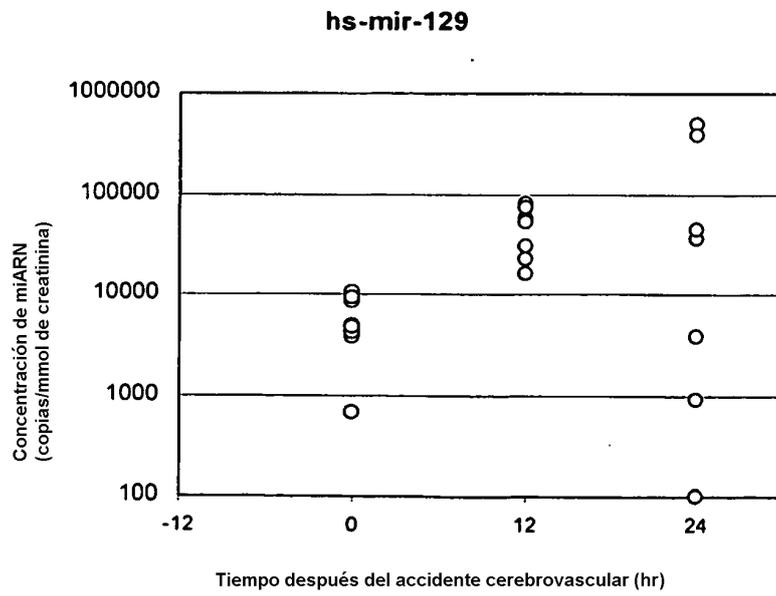
**C**



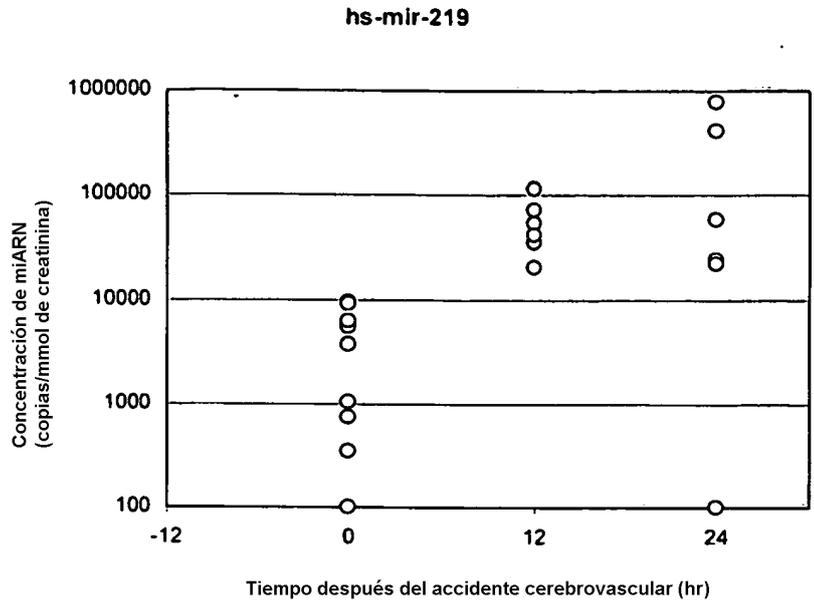
**D**



**E**



**F**



**G**

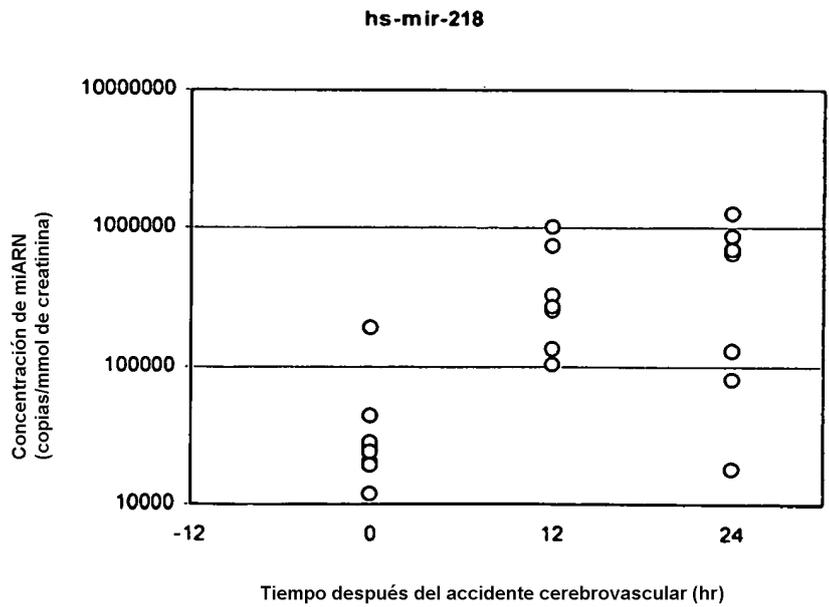


Figura 4

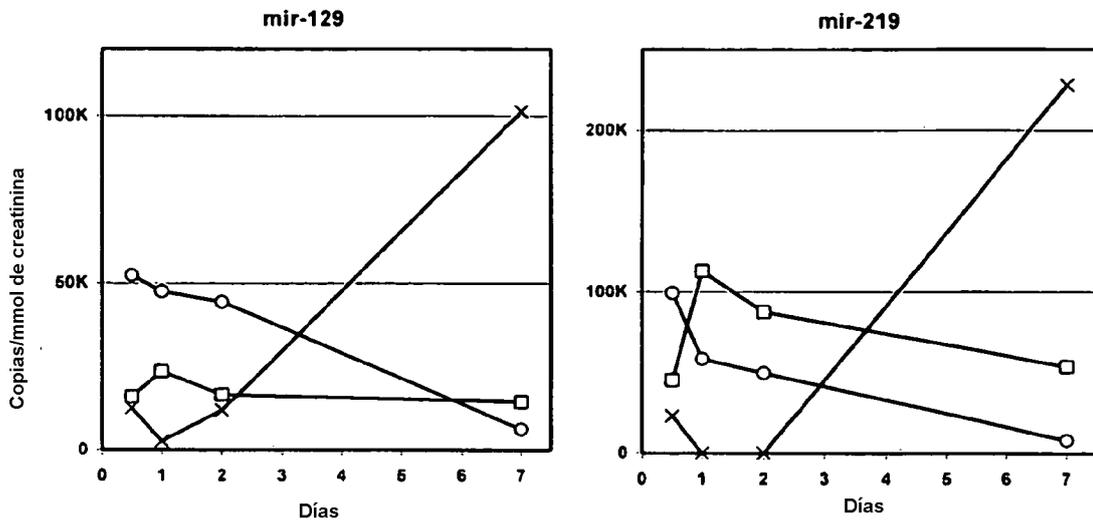
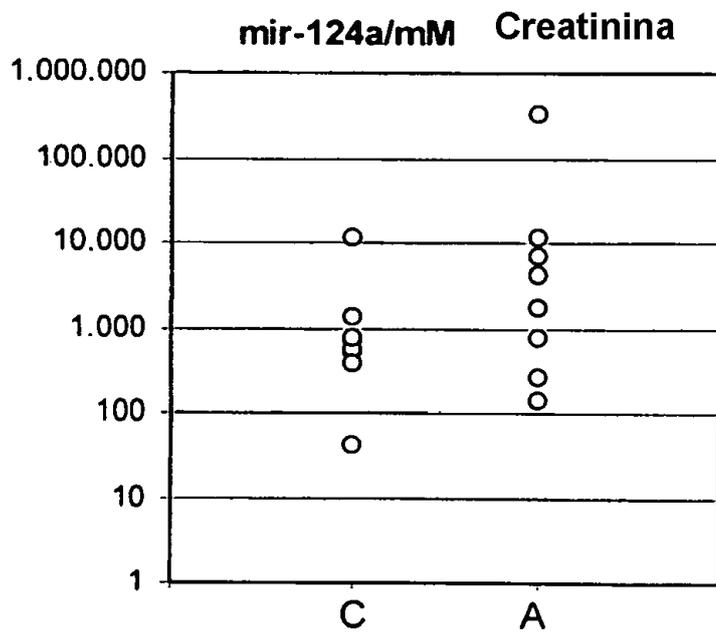
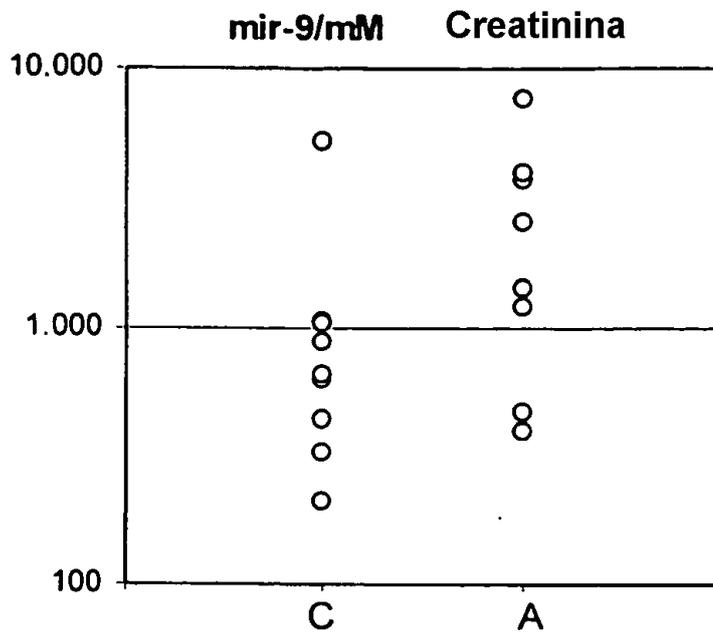
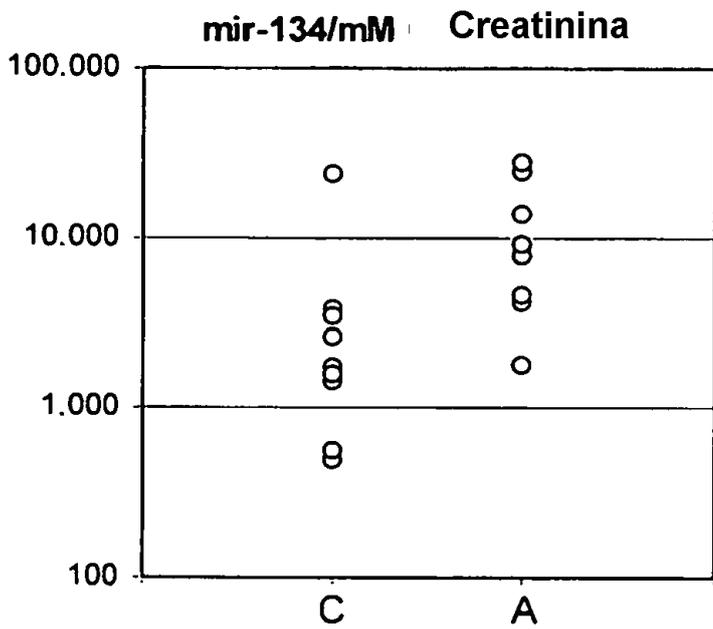
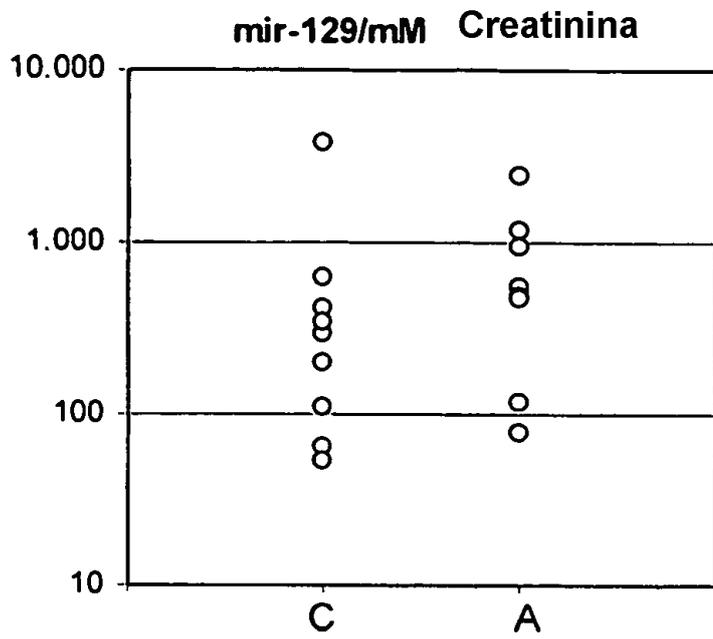


Figura 5





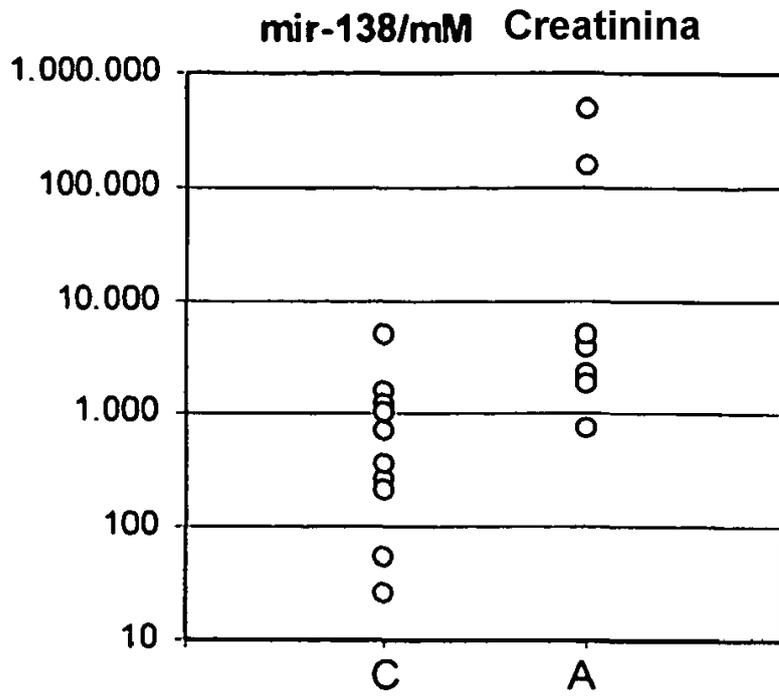
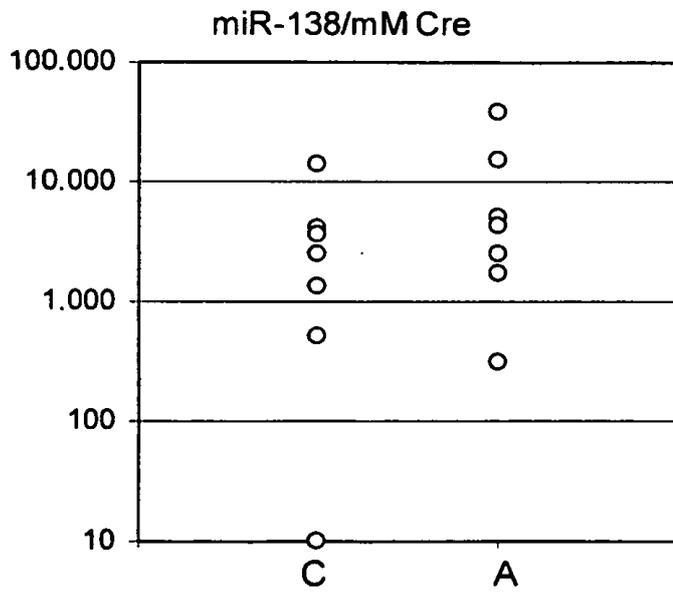
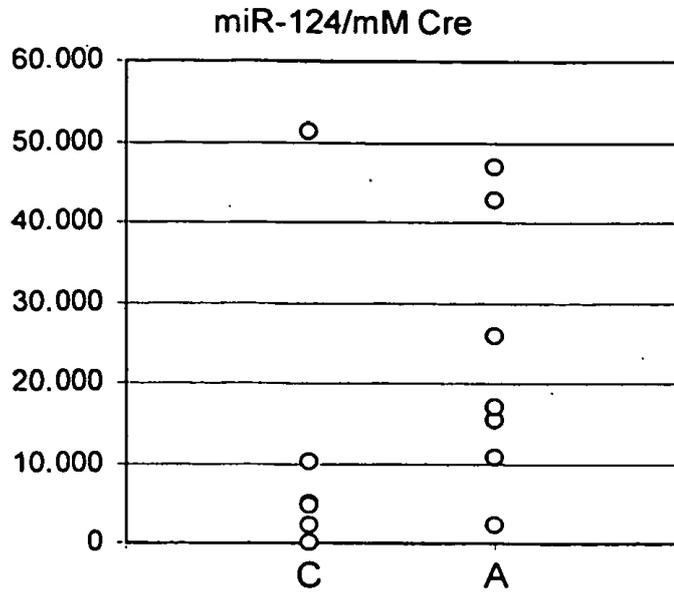


Figura 6



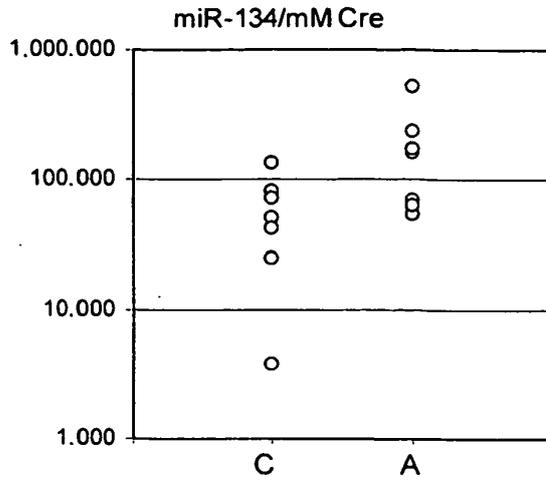
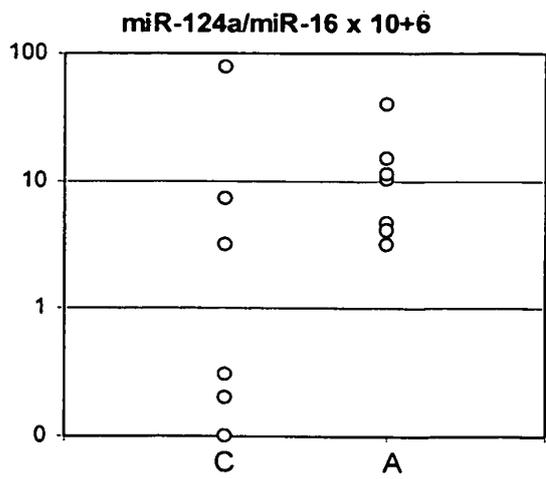


Figura 7



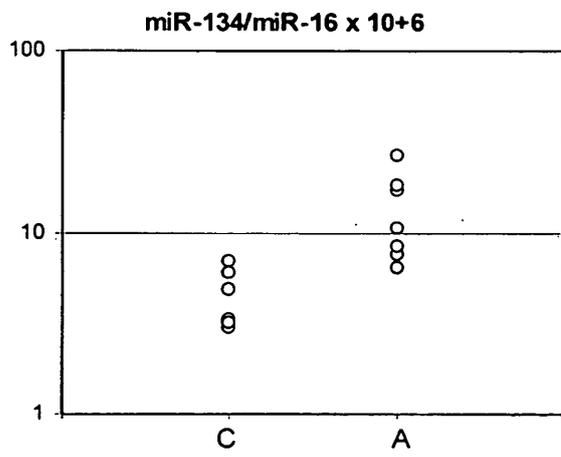
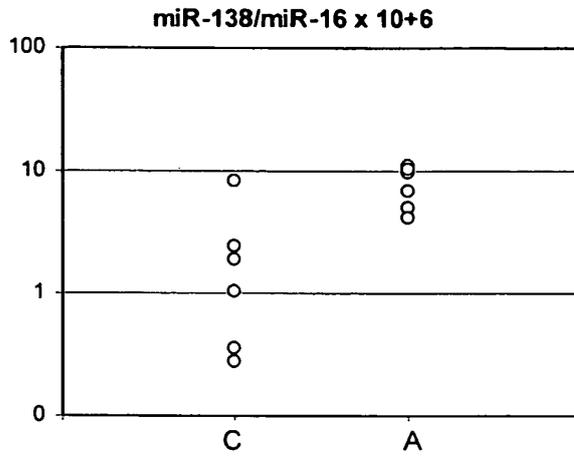
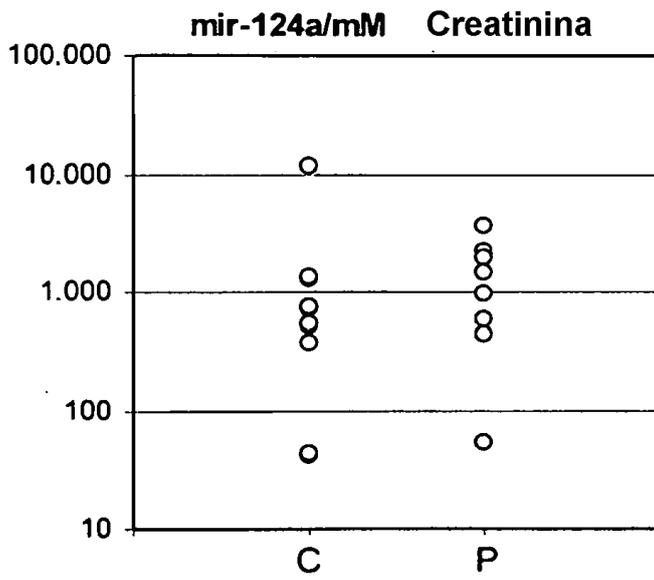
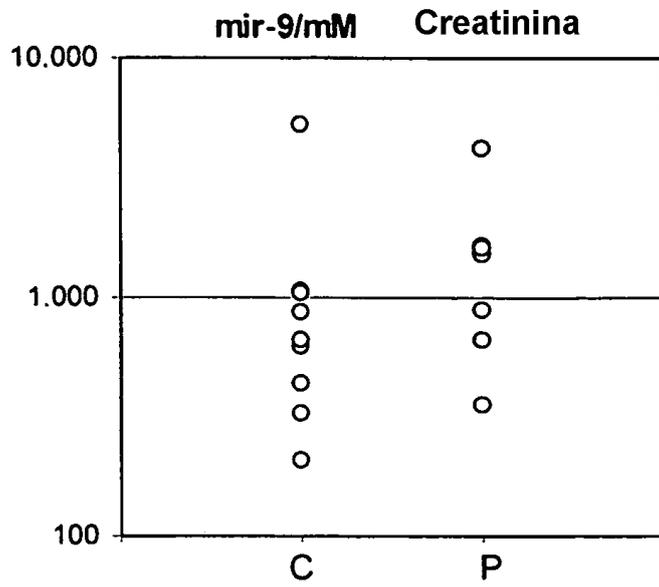


Figura 8



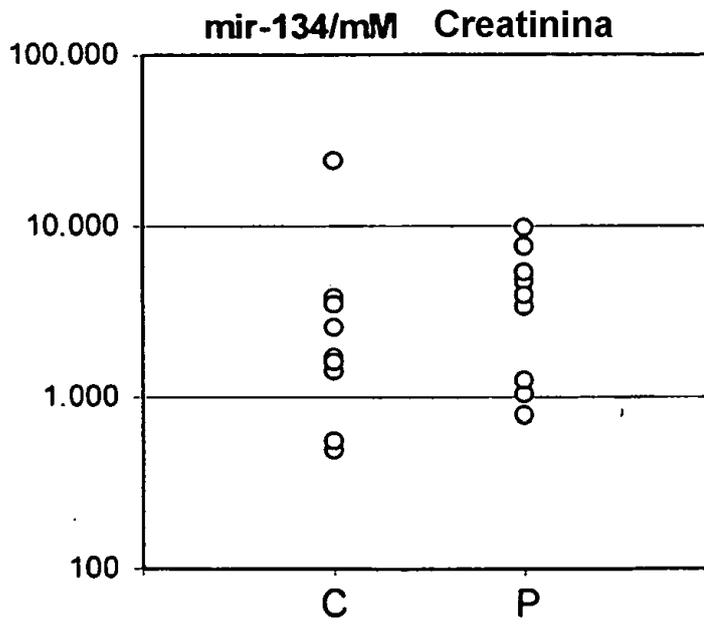
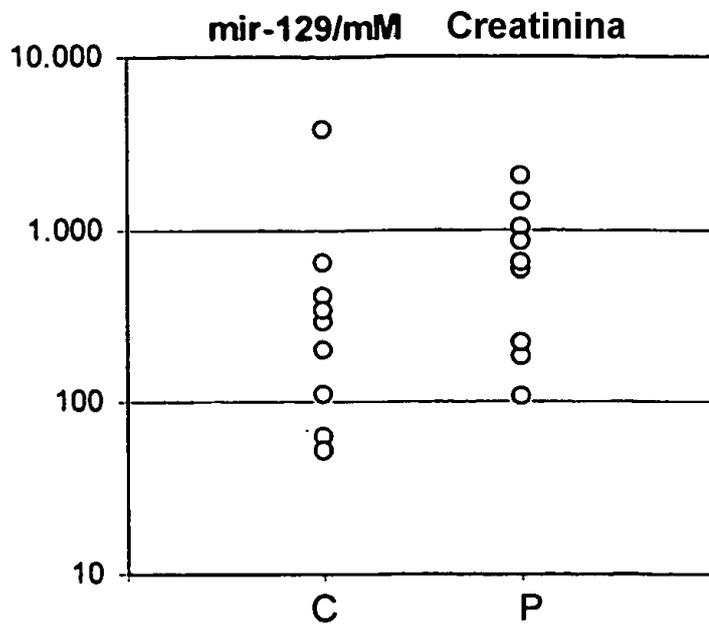


Figura 9

