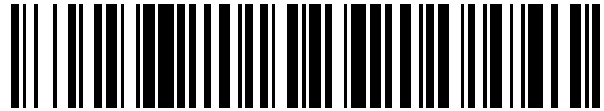


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 452**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2011 E 11765989 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2557162**

54 Título: **Método de detección de un rabdomiosarcoma que utiliza una muestra derivada de un líquido corporal**

30 Prioridad:

08.04.2010 JP 2010089180

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

28.10.2015

73 Titular/es:

**LSIP, LLC (50.0%)
7-12, Marunouchi 1-chome
Chiyoda-ku Tokyo 100-0005, JP y
KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY
CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOSOI, HAJIME y
MIYACHI, MITSURU**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 549 452 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

Método de detección de un rhabdomioma que utiliza una muestra derivada de un líquido corporal.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para detectar un rhabdomioma que utiliza una muestra derivada de un líquido corporal.

10 Técnica anterior

Se ha planteado el desarrollo de una técnica de diagnóstico no invasiva utilizando ADN libre derivado de un tumor en suero (documentos no de patente 1 y 2). En los últimos años se ha confirmado la existencia de microARN (miARN), ARN no codificantes que no se traducen para proporcionar proteínas. Se ha informado de que sus perfiles de expresión son específicos de tejido o de tumor (documentos no de patente 3 y 4). En cánceres pediátricos también, se informa en un estudio utilizando estirpes celulares (documento no de patente 5) e que los perfiles de expresión difieren dependiendo del tumor. En el rhabdomioma, que es el sarcoma de tejidos blandos más común en cánceres pediátricos, se revela que se aumenta la expresión de miARN expresados específicamente en el músculo (documentos no de patente 5 y 6). Adicionalmente, también se revela que existen miARN de origen tumoral en el suero. Por tanto, se sugiere la utilidad de miARN como biomarcadores en cáncer colorrectal, linfoma, cáncer de próstata, cáncer de hígado, y similares (documentos no de patente 7-10).

Documentos de la técnica anterior**25 Documentos no de patente**

Documento no de patente 1: Gotoh, *et al.* J Clin Oncol 23: 5205-5210, 2005

Documento no de patente 2: Yagy, *et al.* Clin Cancer Res 14: 7011-7019, 2008

Documento no de patente 3: Calin GA, *et al.* Nat Rev Cancer; 6: 857-866, 2006

Documento no de patente 4: Lu J, *et al.* Nature; 435: 834-838, 2005

Documento no de patente 5: Wei JS, *et al.* Clin Cancer Res; 15: 5560-5568, 2009

Documento no de patente 6: Subramanian S, *et al.* Oncogene; 27: 2015-2026, 2008

Documento no de patente 7: Ng EKO, *et al.* Gut; 58: 1375-1381, 2009

Documento no de patente 8: Mitchell PS, *et al.* PNAS; 105: 10513-10518, 2008

Documento no de patente 9: Lawrie CH, *et al.* Br J Haematol; 141: 672-675, 2008

Documento no de patente 10: Yamamoto Y, *et al.* Biomarkers; 14: 529-538, 2009

Descripción de la invención**Problema que debe solucionar la invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método de detección de un rhabdomioma que es difícil de diagnosticar fácilmente.

Medios para solucionar el problema

Los inventores cuantificaron hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206, un grupo de miARN expresados específicamente en el músculo, en muestras derivadas de líquidos corporales de pacientes con tumor pediátrico; e investigaron la posibilidad de diagnóstico no invasivo de rhabdomioma. Como resultado, los inventores descubrieron que podía detectarse rhabdomioma mediante estos miARN.

La presente invención proporciona los siguientes métodos para detectar rhabdomiomas.

1. Un método para detectar rhabdomioma que comprende

evaluar un aumento significativo en la expresión de al menos una clase de miARN seleccionado del grupo que consiste en hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206 en una muestra derivada de líquido corporal, en

el que el líquido corporal es sangre y la muestra derivada de líquido corporal es plasma o suero.

2. El método para detectar rhabdomyosarcoma según el punto anterior 1, en el que el patrón de la detección es un aumento significativo en la cantidad de expresión del al menos uno seleccionado del grupo que consiste en hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206 en la muestra derivada de líquido corporal, en comparación con la de un sujeto normal, en el que el líquido corporal es sangre y la muestra derivada de líquido corporal es plasma o suero.
3. El método para detectar rhabdomyosarcoma según el punto anterior 1, en el que la evaluación comprende evaluar la expresión de al menos una clase de miARN seleccionado del grupo que consiste en hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206.
4. El método para detectar rhabdomyosarcoma según el punto anterior 1, en el que la evaluación comprende evaluar la expresión de al menos hsa-miR-206.
5. El método para detectar rhabdomyosarcoma según el punto anterior 1 detectado mediante PCR en tiempo real.

Efectos de la invención

El rhabdomyosarcoma es uno de los tumores que son difíciles de diagnosticar. Sin embargo, según la presente invención, la detección de un rhabdomyosarcoma, que se consideraba imposible en el pasado, puede lograrse utilizando una muestra de líquido corporal.

Con respecto al rhabdomyosarcoma, es importante para la mejora del pronóstico extirpar completamente el tumor de rhabdomyosarcoma antes de la quimioterapia y radioterapia; también es importante realizar un diagnóstico provisional de manera preoperatoria con el fin de determinar un plan de operación cuyo fin sea la extirpación completa inicial. La presente invención permite un diagnóstico más rápido y más preciso del rhabdomyosarcoma, y puede esperarse una mejora en los resultados del tratamiento del rhabdomyosarcoma.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un aumento en la expresión de microARN específicos de músculo en estirpes celulares de rhabdomyosarcoma. El eje de ordenadas es una razón de cada miARN específico de músculo con respecto a hsa-miR-16. RMS: rhabdomyosarcoma, NB: neuroblastoma, EWS: sarcoma de Ewing, MRT: tumor rabdoide maligno.

La figura 2 representa un aumento en la expresión de microARN específicos de músculo en muestras de tumor de rhabdomyosarcoma. El eje de ordenadas es una razón de cada miARN específico de músculo con respecto a hsa-miR-16. RMS: rhabdomyosarcoma, no RMS: tumores distintos de rhabdomyosarcoma.

La figura 3 representa las cantidades de expresión de hsa-miR-1, hsa-miR-206, hsa-miR-133a y hsa-miR-133b en sobrenadantes de cultivo de las estirpes celulares de rhabdomyosarcoma. El eje de ordenadas es una razón de miARN específico de músculo con respecto a hsa-miR-16. RMS: rhabdomyosarcoma, NB: neuroblastoma, EWS: sarcoma de Ewing, MRT: tumor rabdoide maligno.

La figura 4 es una comparación de hsa-miR-1 en suero entre sujetos normales, niños afectados por cáncer y niños afectados por rhabdomyosarcoma (RMS). El eje de ordenadas es una razón de hsa-miR-1 con respecto a hsa-miR-16. RMS: rhabdomyosarcoma, no RMS: tumores distintos de rhabdomyosarcoma.

La figura 5 es una comparación de hsa-miR-133a en suero entre sujetos normales, niños afectados por cáncer y niños afectados por rhabdomyosarcoma (RMS). El eje de ordenadas es una razón de hsa-miR-133a con respecto a hsa-miR-16. RMS: rhabdomyosarcoma, no RMS: tumores distintos de rhabdomyosarcoma.

La figura 6 es una comparación de hsa-miR-133b en suero entre sujetos normales, niños afectados por cáncer y niños afectados por rhabdomyosarcoma (RMS). El eje de ordenadas es una razón de hsa-miR-133b con respecto a hsa-miR-16. RMS: rhabdomyosarcoma, no RMS: tumores distintos de rhabdomyosarcoma.

La figura 7 es una comparación de hsa-miR-206 en suero entre sujetos normales, niños afectados por cáncer y niños afectados por rhabdomyosarcoma (RMS). El eje de ordenadas es una razón de hsa-miR-206 con respecto a hsa-miR-16. RMS: rhabdomyosarcoma, no RMS: tumores distintos de rhabdomyosarcoma.

La figura 8 representa una disminución en la razón de cada miARN específico de músculo con respecto a hsa-miR-16 en niños afectados por RMS tras el tratamiento. El eje de ordenadas es una razón del miARN específico de músculo con respecto a hsa-miR-16.

La figura 9 representa la estabilidad de miARN en suero humano. La estabilidad de microARN en suero se estudió en almacenamiento a 4°C. Los valores de Ct tanto de hsa-miR-16 como de hsa-miR-133b tienden a aumentar

gradualmente a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, y aumentaron en 3 y 4 en el día 30 (disminución hasta 1/16 y 1/8 como cantidad absoluta). Por otro lado, no se observó un gran cambio en la razón de hsa-miR-133b con respecto a hsa-miR-16.

5 La figura 10 representa el reflejo del miARN específico de músculo en suero sobre la actividad patológica de rdbdomiosarcoma.

La figura 11 representa la detección adicional del miARN específico de músculo en líquido corporal (líquido cefalorraquídeo y efusión pleural) distinto de suero de niños con rdbdomiosarcoma.

10 La figura 12 representa el reflejo del miARN específico de músculo en líquido corporal sobre el estado del rdbdomiosarcoma.

Modos de poner en práctica la invención

15 A continuación se muestran las secuencias de hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206, que son objeto de detección en la presente invención. Estas secuencias se indican en la tabla 1 junto con la secuencia de hsa-miR-16, que puede utilizarse como control interno debido a su alta expresión y menor variación entre tejidos.

20 Tabla 1

miARN	Secuencias de ARN	SEC ID
hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	SEC ID NO. 1
hsa-miR-133a	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	SEC ID NO. 2
hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA	SEC ID NO. 3
hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	SEC ID NO. 4
hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	SEC ID NO. 5

25 Tal como se ilustra en la figura 3, se liberan hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206 a los sobrenadantes de cultivo de las estirpes celulares de rdbdomiosarcoma en una gran cantidad, y están presentes miARN libres de células derivados de tumor liberados desde el interior de células tumorales. También están presentes miARN libres de células, derivados de tumor en líquido corporal en un cuerpo humano. Por tanto, se cree que tales miARN pueden utilizarse para la detección y el diagnóstico de rdbdomiosarcoma.

30 En la presente memoria, el líquido corporal incluye sangre, efusión pleural, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo, orina, y similares. La sangre es útil independientemente del sitio de aparición o el sitio de metástasis del rdbdomiosarcoma. Sin embargo, cuando el sitio de aparición o el sitio de metástasis es un órgano urinario, la orina es útil. Cuando el sitio es el sistema nervioso central, el líquido cefalorraquídeo es útil. Cuando el sitio es la cavidad abdominal, el líquido ascítico es útil. Cuando el sitio es la cavidad pleural, la efusión pleural es útil.

35 Cuando se utiliza sangre como líquido corporal, se centrifuga una muestra de sangre (plasma o suero) a 18.000 g durante 10 minutos, y es necesaria la utilización del sobrenadante para impedir la mezcla de leucocitos o eritrocitos en la misma.

40 El miARN utilizado en la presente invención puede detectarse también a partir de una muestra de suero de hace 20 años que se almacenó a -20°C, y presenta estabilidad suficiente en el suero como para utilizarse para la presente invención (figura 9). Por ejemplo, cuando se almacenó el suero durante 30 días a 4°C, las cantidades de hsa-miR-16 y hsa-miR-133b disminuyeron hasta aproximadamente 1/16 y aproximadamente 1/8 como cantidad absoluta, respectivamente; sin embargo, no se observó un gran cambio en la razón de hsa-miR-133b con respecto a hsa-miR-16.

45 La detección y cuantificación de miARN puede llevarse a cabo mediante transcripción inversa de la muestra que contiene miARN para obtener ADNc, y realizando un método adecuado tal como PCR en tiempo real cuantitativa del ADNc. El ADNc puede prepararse mediante una reacción de transcripción inversa utilizando, por ejemplo, un kit de TR de microARN TaqMan (Applied Biosystems); cebadores de RT de microARN maduros de ensayos de microARN TaqMan; y similares. La PCR en tiempo real cuantitativa puede llevarse a cabo utilizando sondas y cebadores TaqMan de ensayos de microARN TaqMan, y mezcla maestra de PCR universal TaqMan.

50 En la detección de rdbdomiosarcoma, la expresión de miARN específico de músculo aumenta significativamente en un grupo de rdbdomiosarcoma a $p < 0,05$.

55 Como miARN que va a medirse, se considera que hsa-miR-206, que presenta la mayor sensibilidad y especificidad, es útil. Con respecto a hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206, se aprecia una correlación de un tumor con la cantidad de microARN.

En la detección de rhabdomiocarcinoma de la presente invención, se espera que la razón de miARN específico de músculo (hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206) con respecto a hsa-miR-16, es decir, miARN específico de músculo/hsa-miR-16, sea un biomarcador de líquido corporal, especialmente suero, en el momento del diagnóstico de rhabdomiocarcinoma.

Según el método de detección de la presente invención, puede detectarse un rhabdomiocarcinoma (RMS) de manera diferenciada con respecto a otros tumores de niños tales como neuroblastoma (NB), sarcoma de Ewing (EWS) y tumor rabdoide maligno (MRT). Convencionalmente, la distinción de RMS con respecto a estos tumores era difícil. La presente invención proporciona medios extremadamente eficaces para la detección específica de rhabdomiocarcinoma.

Puesto que la cantidad del miARN específico de músculo de la presente invención disminuye tras el tratamiento de rhabdomiocarcinoma, también se convierte en un índice de actividad patológica y respuesta terapéutica (figuras 8, 10 y 11).

La presente invención se describe con mayor detalle en los siguientes ejemplos, pero no se limita a estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

1. Método

Estirpes celulares, muestras de tumor y sueros

Se realizaron unos estudios utilizando lo siguiente mantenido por el Departamento de Pediatría, Universidad de Medicina de la prefectura de Kyoto:

16 estirpes celulares (7 de rhabdomiocarcinoma, 4 de neuroblastoma, 3 de sarcoma de Ewing, 2 de tumor rabdoide maligno);

21 muestras de tumor (7 de rhabdomiocarcinoma, 4 de sarcoma no diferenciado, 2 de tumor de Wilm, 2 de neuroblastoma, 1 de sarcoma de Ewing, 1 de tumor rabdoide maligno, 1 de cáncer suprarrenal, 1 de retinoblastoma, 1 de sarcoma de tejidos blandos alveolar, 1 de osteosarcoma);

48 muestras de suero (8 de rhabdomiocarcinoma, 3 de neuroblastoma, 2 de tumor de Wilm, 2 de sarcoma de Ewing, 2 de hepatoblastoma, 2 de retinoblastoma, 2 de osteosarcoma, 2 de sarcoma no diferenciado, 1 de tumor rabdoide maligno, 1 de sarcoma de tejidos blandos alveolar celular, 1 de cáncer suprarrenal, 1 de blastocitoma de páncreas, 1 de tumor teratoide, 1 de leucemia linfoblástica aguda, y 1 de histiocitosis de células de Langerhans, 1 de neuroglioma, y 17 voluntarios que son sujetos normales); y

15 muestras de líquido corporal (2 de rhabdomiocarcinoma (1 de líquido cefalorraquídeo y 1 de efusión pleural), 3 de neuroblastoma (1 de líquido cefalorraquídeo, 1 de efusión pleural y 1 de líquido ascítico), 3 de meduloblastoma (3 de líquido cefalorraquídeo), 1 de ependimoma (1 de líquido cefalorraquídeo), 1 de retinoblastoma (1 de líquido cefalorraquídeo), 1 de tumor rabdoide maligno (1 de líquido cefalorraquídeo), 1 de tumor de Wilm (1 de líquido cefalorraquídeo), 1 de tumor de células germinales (1 de líquido ascítico), 1 de quilotórax (1 de efusión pleural), y 1 de enfermedad autoinmunitaria (1 de líquido cefalorraquídeo)).

Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total que contenía miARN utilizando un kit mirVana PARIS (Ambion). Con respecto al sobrenadante de cultivo de estirpes celulares o sueros, se centrifugan adicionalmente a 15.000 rpm durante 10 minutos para eliminar componentes celulares, y se utilizaron los sobrenadantes.

Reacción de transcripción inversa

Se realizó la reacción de transcripción inversa utilizando el kit de RT de microARN TaqMan (Applied Biosystems) y cebadores para una reacción de transcripción inversa específica de miARN maduros de ensayos de microARN TaqMan (Applied Biosystems).

PCR en tiempo real cuantitativa

Se realizó PCR en tiempo real cuantitativa utilizando una disolución de ADNc sometido a transcripción inversa, y los cebadores y las sondas de ensayos de microARN TaqMan. En muestras distintas de líquido corporal, hubo poca variación en las expresiones entre tejidos. Por tanto, se utilizó hsa-miR-16 que se expresa a alto nivel como control interno, y se normalizó la expresión de miARN específico de músculo para la cuantificación utilizando el método de

ΔΔCt. En la muestra de líquido corporal, la expresión de hsa-miR-16 no era constante. Por tanto, se preparó la curva patrón utilizando un miARN sintético que presenta un número de copias conocido, y se realizó la cuantificación utilizando una cantidad absoluta. Se calculó el número de copias de hsa-miR-206 por 1 μl de suero y se comparó. En la tabla 1 se muestran las secuencias de miARN específicos de músculo (hsa-miR-1, 133a, 133b y 206) y hsa-miR-16.

Análisis estadístico

Se comparó la expresión de miARN en suero utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney. Se examinó la correlación de un tumor con la expresión de miARN en suero utilizando el coeficiente de correlación de rangos de Spearman. Cada prueba era una prueba bilateral, y se consideró una p menor de (p < 0,05) como significativamente diferente.

Análisis estadístico

Se comparó la expresión de miARN en suero utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney. Se examinó la correlación de un tumor con la expresión de miARN en suero utilizando el coeficiente de correlación de rangos de Spearman. Cada prueba era una prueba bilateral, y se consideró una p menor de (p < 0,05) como significativamente diferente.

2. Resultado

Expresión de miARN específicos de músculo en estirpes celulares

En el estudio de las estirpes celulares, la expresión de miARN específicos de músculo en las estirpes celulares de rabdomiosarcoma (n = 7) aumentó en comparación con aquella en las estirpes celulares de neuroblastoma (n = 4), sarcoma de Ewing (n = 3) y tumor rabdoide maligno (n = 2) (figura 1).

Expresión de miARN específico de músculo en muestras clínicas de tumor

En el estudio de las muestras clínicas de tumor, la expresión de miARN específicos de músculo aumentó en las muestras de tumor de rabdomiosarcoma (n = 7) en comparación con aquella en otras muestras de tumor de cáncer pediátrico (n = 14) (figura 2).

Expresión de miARN específicos de músculo en sobrenadantes de cultivo de las estirpes celulares

En el estudio de sobrenadantes de cultivo de las estirpes celulares, la expresión de miARN específicos de músculo aumentó en los sobrenadantes de cultivo (n = 7) de las estirpes celulares de rabdomiosarcoma en comparación con los sobrenadantes de cultivo de neuroblastoma (n = 4), sarcoma de Ewing (n = 3) y tumor rabdoide maligno (n = 2) (figura 3).

Expresión de miARN específicos de músculo en sueros

En el estudio de suero, en los sueros (n = 8) de niños afectados por rabdomiosarcoma, la expresión de miARN específicos de músculo aumentó con diferencia estadísticamente significativa en comparación con los sueros de niños afectados por otros cánceres pediátricos (n = 23) y los sueros de voluntarios que eran sujetos normales (n = 17) (figuras 4-7). Cuando se fijó el valor de corte, y se calcularon la sensibilidad y especificidad utilizando la curva ROC, hsa-miR-206 mostró la mayor sensibilidad y especificidad; la sensibilidad era del 100%, y la especificidad era del 91,3% (figura 7). Con respecto a los sujetos a partir de los cuales se obtuvieron las muestras tanto de un tumor como de suero, se estudió la correlación de la expresión de miARN. Los resultados mostraron que hsa-miR-1 no era estadísticamente significativo; sin embargo, había una tendencia a correlacionarse (p = 0,0793), y se observó una correlación significativa en hsa-miR-133a, 133b y 206 (tabla 2). Además, en los tres casos en los que se obtuvo un par de sueros antes y después del tratamiento, se examinó el cambio en la expresión de miARN específicos de músculo debido al tratamiento. Tras el tratamiento, cada valor era menor al valor de corte, y la expresión disminuyó hasta un nivel similar al de los voluntarios que eran sujetos normales (figura 8). Los miARN específicos de músculo en suero aumentan o disminuyen reflejando el estado del rabdomiosarcoma. Cuando el tratamiento era satisfactorio, la expresión disminuía. En el momento de la recidiva y el empeoramiento, la expresión aumentaba (figura 10).

Tabla 2

hsa-miARN	Rs	valor de p
1	0,48417	0,0793
133a	0,544	0,044
133b	0,557	0,038
206	0,780	0,001

Expresión de miARN específicos de músculo en líquido corporal

Adicionalmente, en líquido corporal distinto de suero, tal como líquido cefalorraquídeo y efusión pleural, la expresión de miARN específicos de músculo tenía valores altos en los pacientes con rhabdomioma (n = 2) en comparación con la de los pacientes sin rhabdomioma (n = 13) (figura 11). En el líquido cefalorraquídeo del paciente con rhabdomioma que también mostró los síntomas de carcinomatosis meníngea, la expresión varió reflejando la actividad patológica y la respuesta terapéutica. Cuando el tratamiento era satisfactorio, la expresión disminuía. En el momento de la recidiva y el empeoramiento, la expresión aumentaba (figura 12).

3. Discusión

La expresión de miARN específicos de músculo aumentó tanto en las estirpes celulares de rhabdomioma como en las muestras clínicas de tumor. Estos resultados no contradecían el hecho de que el rhabdomioma es un tumor que se origina en miocitos no diferenciados. Los miARN específicos de músculo también podían detectarse a partir de un sobrenadante de cultivo de las estirpes celulares en el que se eliminan los componentes celulares. La expresión de los miARN específicos de músculo aumentó más en rhabdomioma. Esto sugiere que los miARN específicos de músculo se liberan fuera de las células. En combinación con los resultados de las muestras clínicas de tumor, se consideró que el miARN específico de músculo también existe en una gran cantidad en el suero de pacientes con rhabdomioma.

En los estudios de suero, la expresión de cualquier miARN específico de músculo aumentó significativamente en sueros de pacientes con rhabdomioma, y la expresión se consideró útil para el diagnóstico preoperatorio de rhabdomioma. En particular, se cree que hsa-miR-206 es el más útil como biomarcador porque la sensibilidad era del 100% y la especificidad era del 91,3%. Además, se apreció una correlación entre la muestra clínica de tumor y la cantidad de expresión de miARN en suero. Además, la expresión de miARN específicos de músculo disminuye hasta un nivel similar al de los voluntarios que son sujetos normales tras el tratamiento. Esto sugiere que los miARN detectados en suero se derivan de un tumor. En un líquido corporal distinto del suero las expresiones de miARN específicos de músculo también tenían valores altos en los pacientes con rhabdomioma, y las expresiones cambiaban dependiendo de la actividad patológica y la respuesta terapéutica.

Aunque el rhabdomioma es el sarcoma de tejidos blandos más común en niños, actualmente no hay ningún biomarcador que pueda medirse en un análisis de sangre. Mientras tanto, puesto que la existencia del tumor residual después de una operación primaria es un factor de pronóstico adverso, si el diagnóstico provisional del rhabdomioma se realiza antes de la operación primaria, es posible un plan de operación cuyo fin sea la extirpación total. Por tanto, la existencia del biomarcador no invasivo que conduce al diagnóstico preoperatorio del rhabdomioma es importante. Se cree que los miARN específicos de músculo examinados esta vez son nuevos biomarcadores que hacen posible un diagnóstico preoperatorio del rhabdomioma con alta sensibilidad y especificidad, y que pueden contribuir a una mejora del pronóstico.

Lista de secuencias

<110> KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION

<120> Método para la detección de un rhabdomioma que utiliza una muestra de sangre

<130> P11-024

<150> Documento JP 2010-089180

<151> 08-04-2010

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 22

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

uggaauguaa agaaguaugu au

22

<210> 2

<211> 22

<212> ARN

ES 2 549 452 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 2
5 uuuggucccc uucaaccagc ug 22

<210> 3
<211> 22
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 3
uuuggucccc uucaaccagc ua 22

<210> 4
15 <211> 22
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

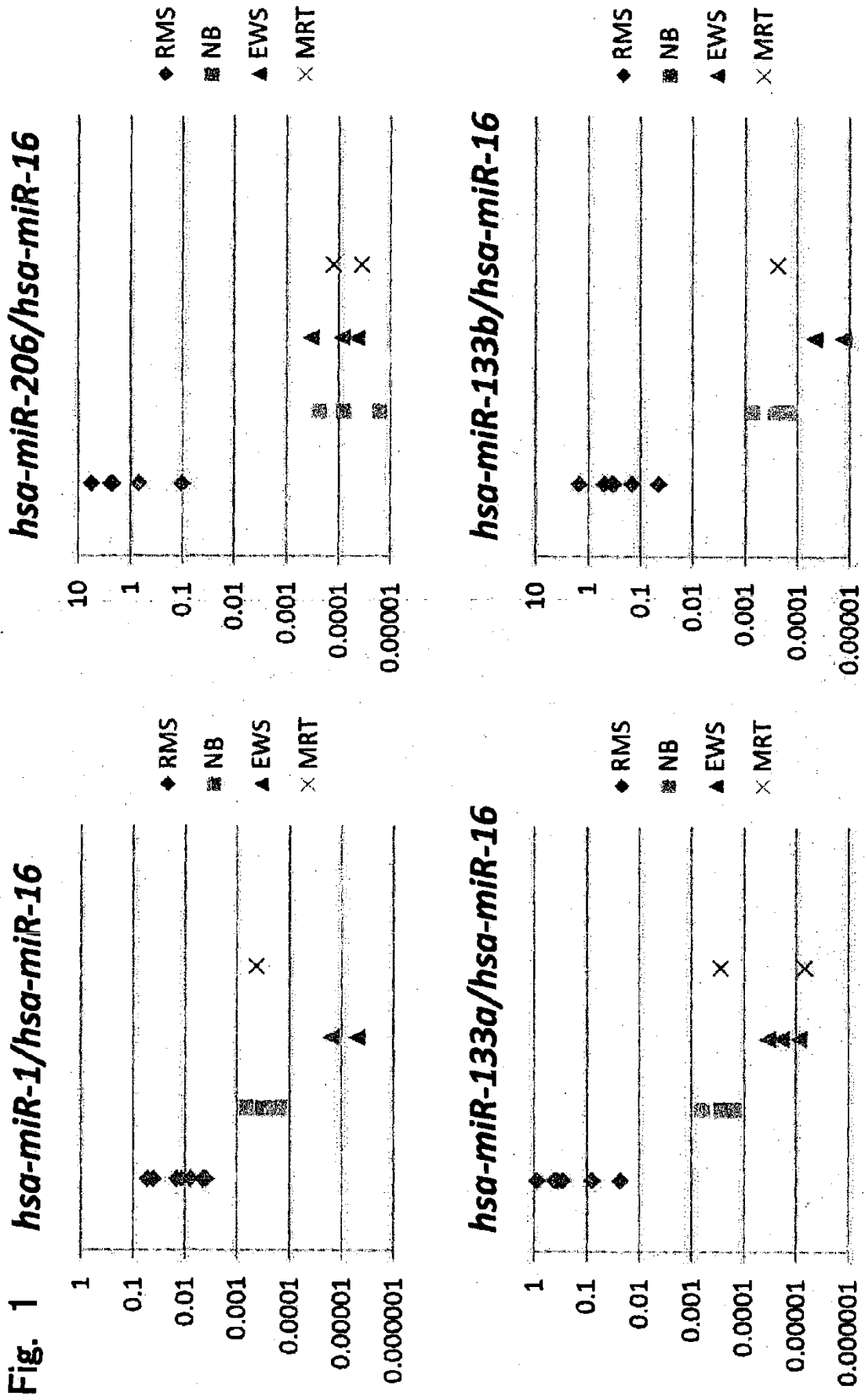
<400> 4
20 uggaauguaa ggaagugugu gg 22

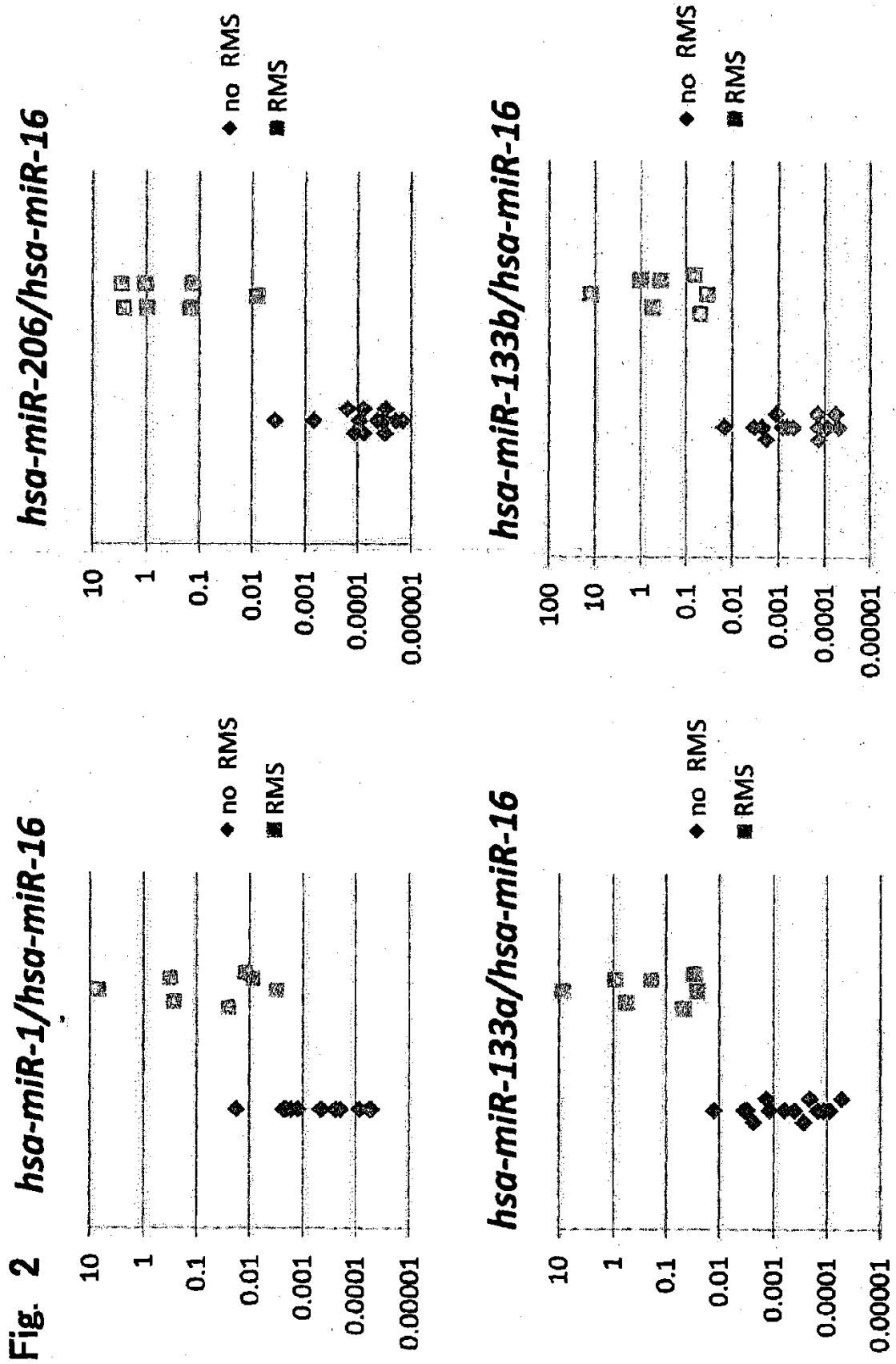
<210> 5
<211> 22
<212> ARN
25 <213> *Homo sapiens*

<400> 5
uagcagcacg uaaauauugg cg 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para detectar un rhabdomioma que comprende evaluar un aumento significativo en la expresión de por lo menos una clase de miARN seleccionada de entre el grupo que consiste en hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206 en una muestra derivada de líquido corporal, en el que el líquido corporal es la sangre y la muestra derivada de líquido corporal es el plasma o el suero.
- 10 2. Método para detectar un rhabdomioma según la reivindicación 1, en el que el patrón de la detección es un aumento significativo en la cantidad de expresión de dicha por lo menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206 en la muestra derivada de líquido corporal, en comparación con la de un sujeto normal, en el que el líquido corporal es la sangre y la muestra derivada de líquido corporal es el plasma o el suero.
- 15 3. Método para detectar un rhabdomioma según la reivindicación 1, en el que la evaluación comprende evaluar la expresión de una clase de miARN seleccionada de entre el grupo que consiste en hsa-miR-133a, hsa-miR-133b y hsa-miR-206.
- 20 4. Método para detectar un rhabdomioma según la reivindicación 1, en el que la evaluación comprende evaluar la expresión de por lo menos hsa-miR-206.
5. Método para detectar un rhabdomioma según la reivindicación 1, detectado mediante PCR en tiempo real.





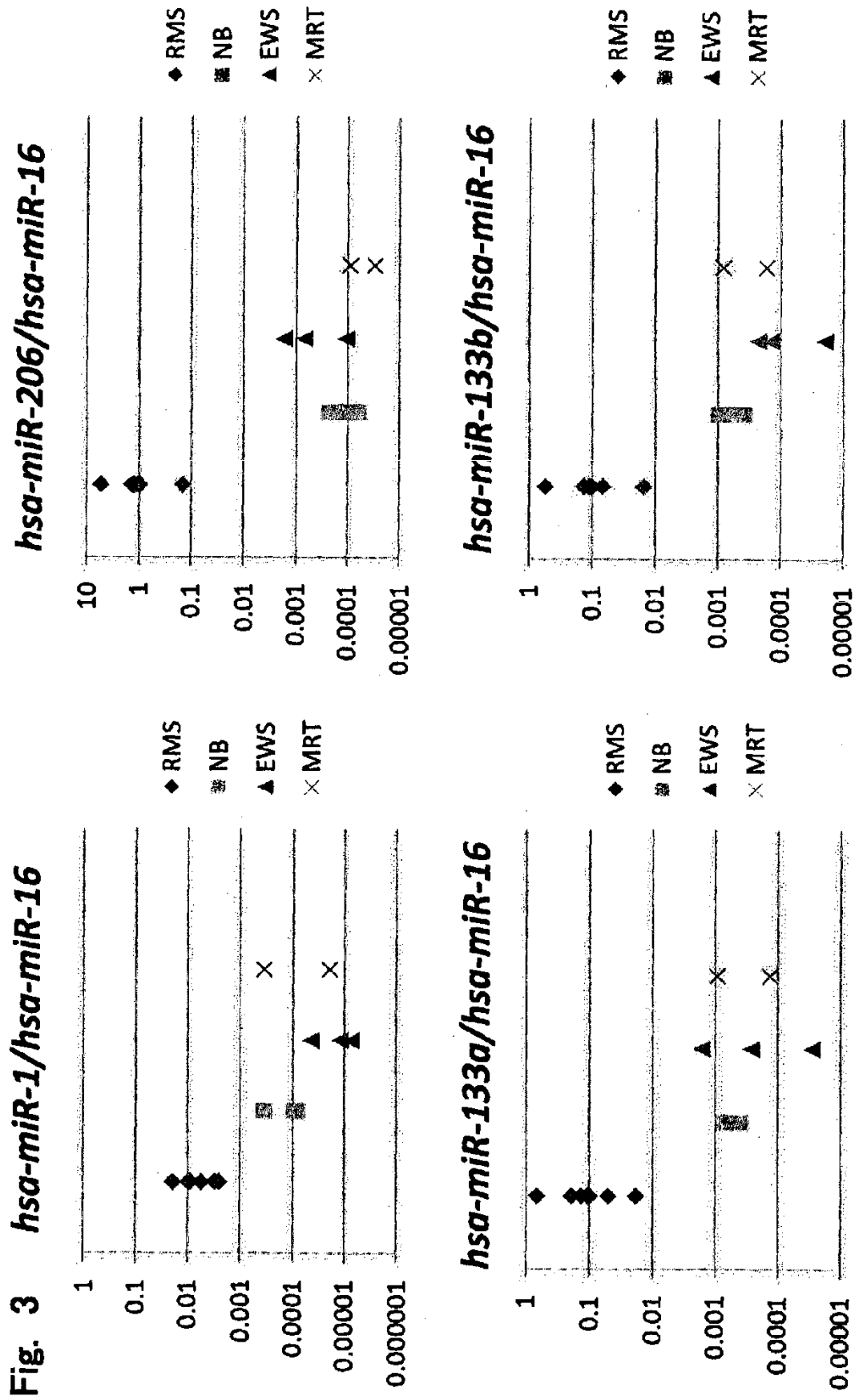


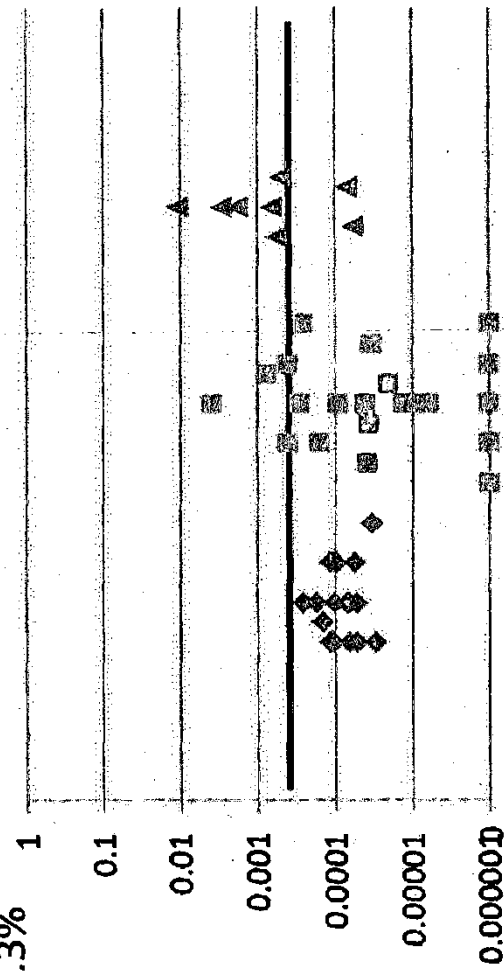
Fig. 4

Corte 4.8E-04

Sensibilidad 75.0%

Especificidad 91.3%

hsa-miR-1/hsa-miR-16



Sujetos normales

Niños afectados por tumor distinto de RMS

Niños afectados por RMS

p=0.008

p=0.027

p=0.073

Fig. 5
Corte 4.0E-04
Sensibilidad 87.5%
Especificidad 69.5%

hsa-miR-133a/hsa-miR-16

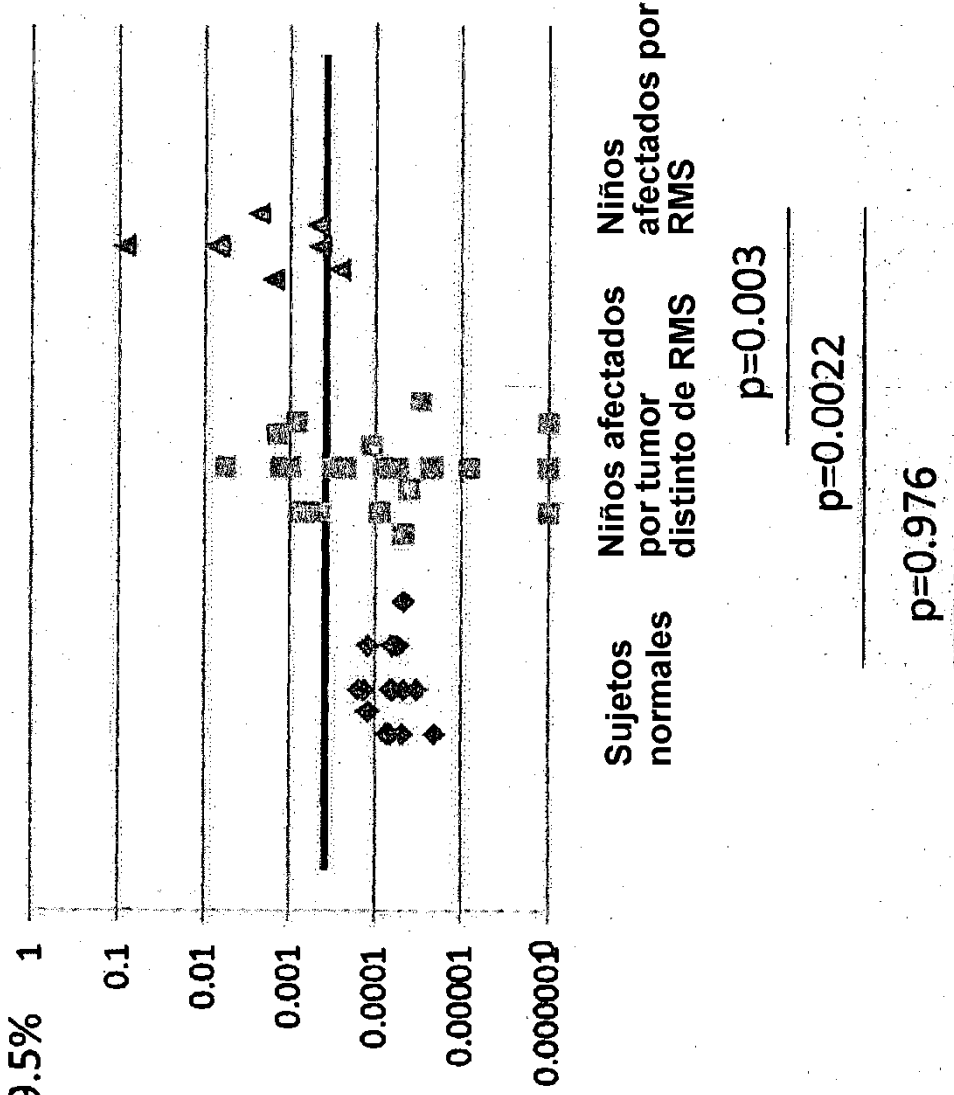
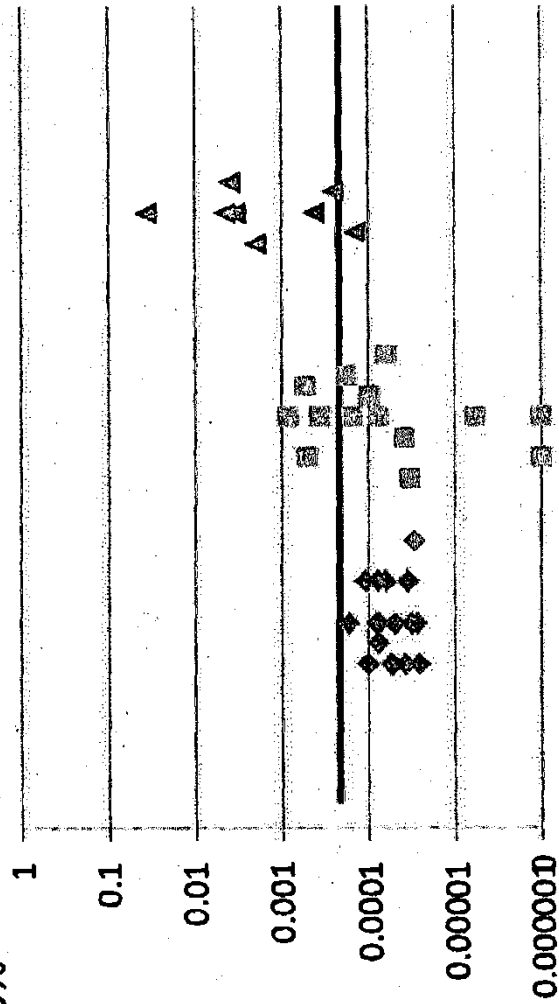


Fig. 6

Corte 2.5E-04
 Sensibilidad 87.5%
 Especificidad 82.6%

hsa-miR-133b/hsa-miR-16

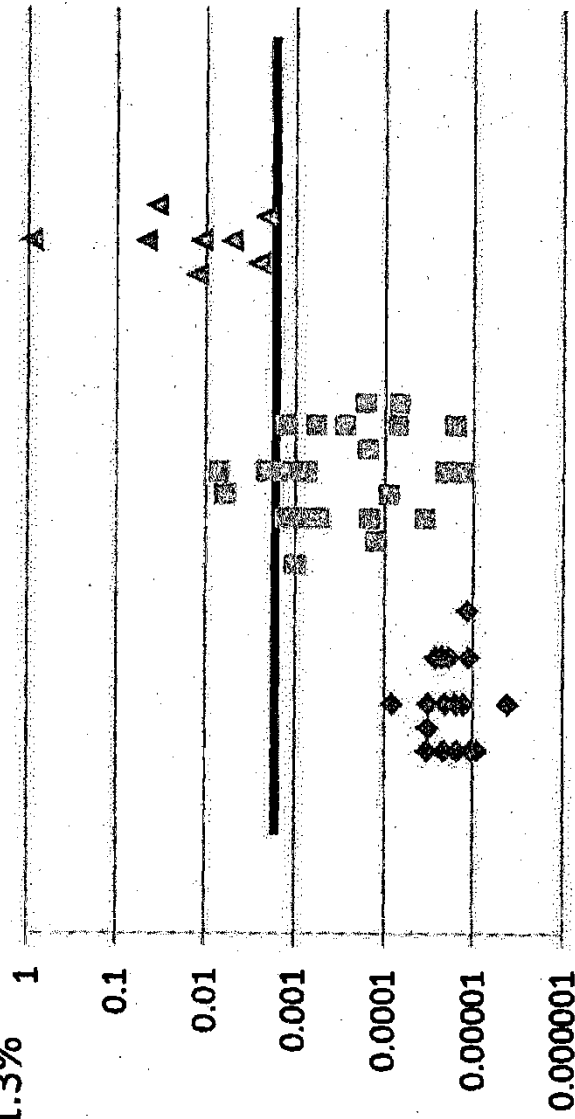


Sujetos normales	Niños afectados por tumor distinto de RMS	Niños afectados por RMS
	$p=0.0022$	$p=0.006$
	$p=0.468$	

Fig. 7

Corte 2.1E-03
Sensibilidad 100%
Especificidad 91.3%

hsa-miR-206/hsa-miR-16



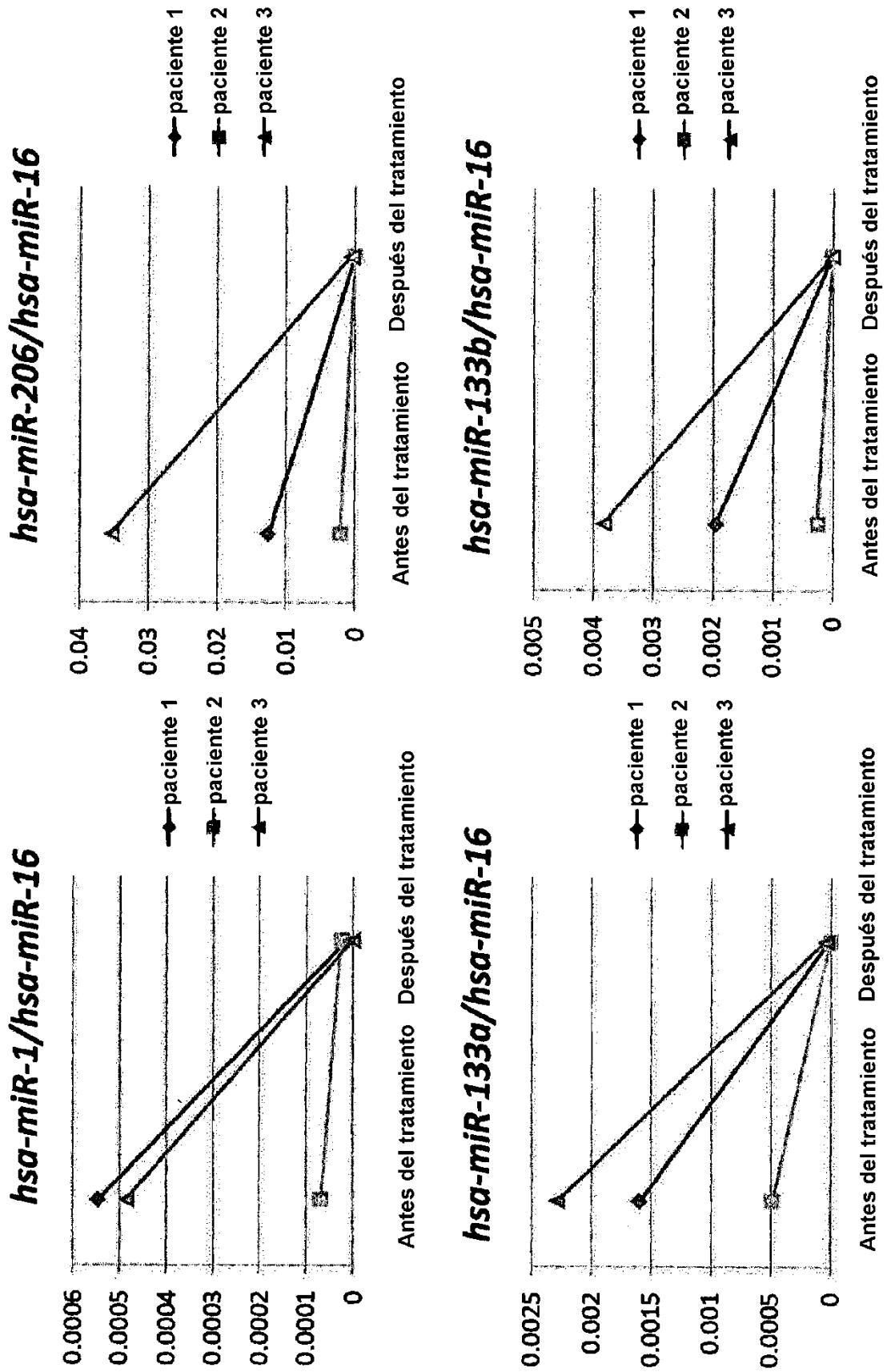
Sujetos normales Niños afectados por tumor distinto de RMS Niños afectados por RMS

$p=0.0008$

$p=0.0003$

$p=0.0001$

Fig. 8



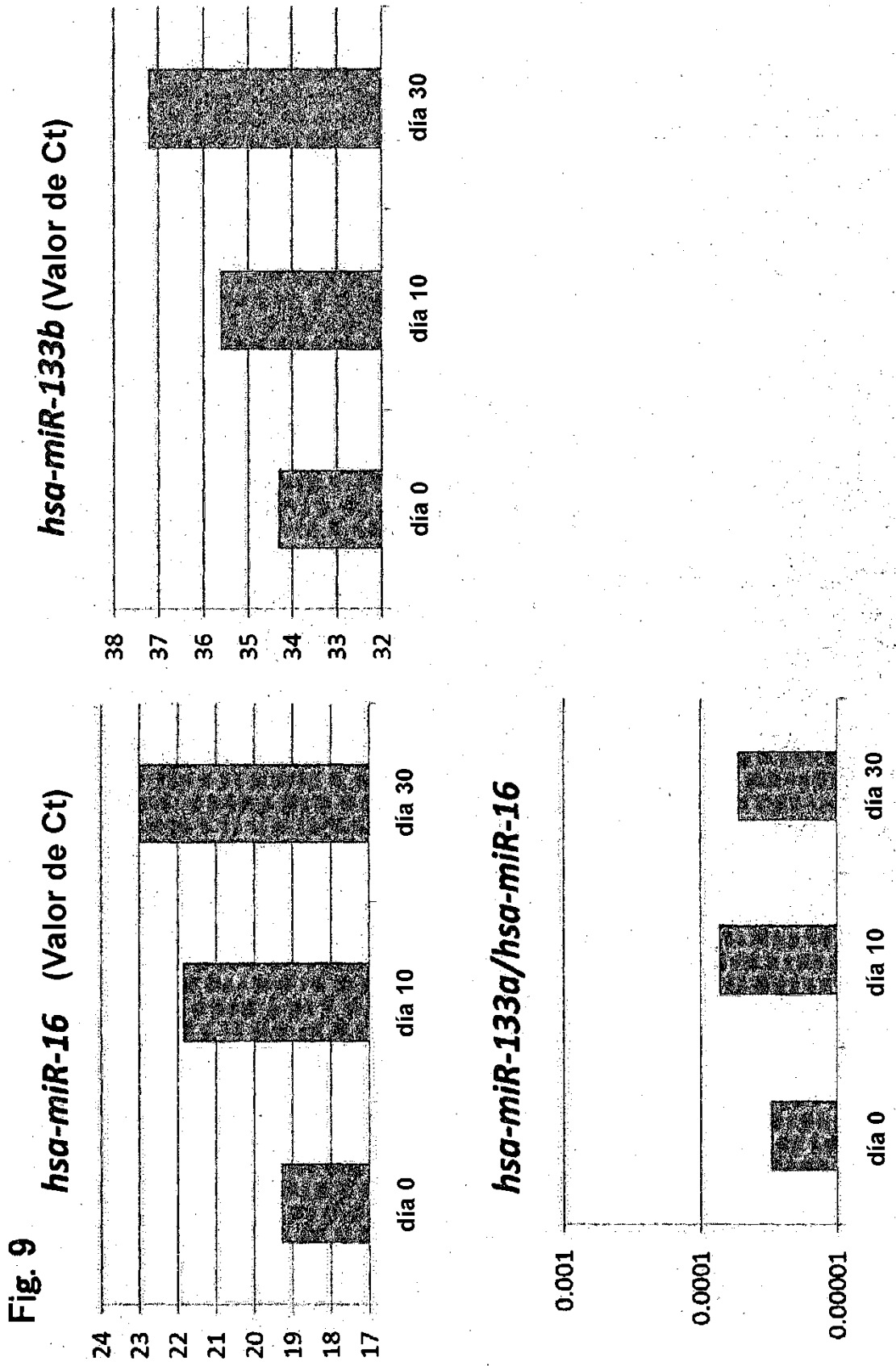


Fig. 10

hsa-miR-206/hsa-miR-16

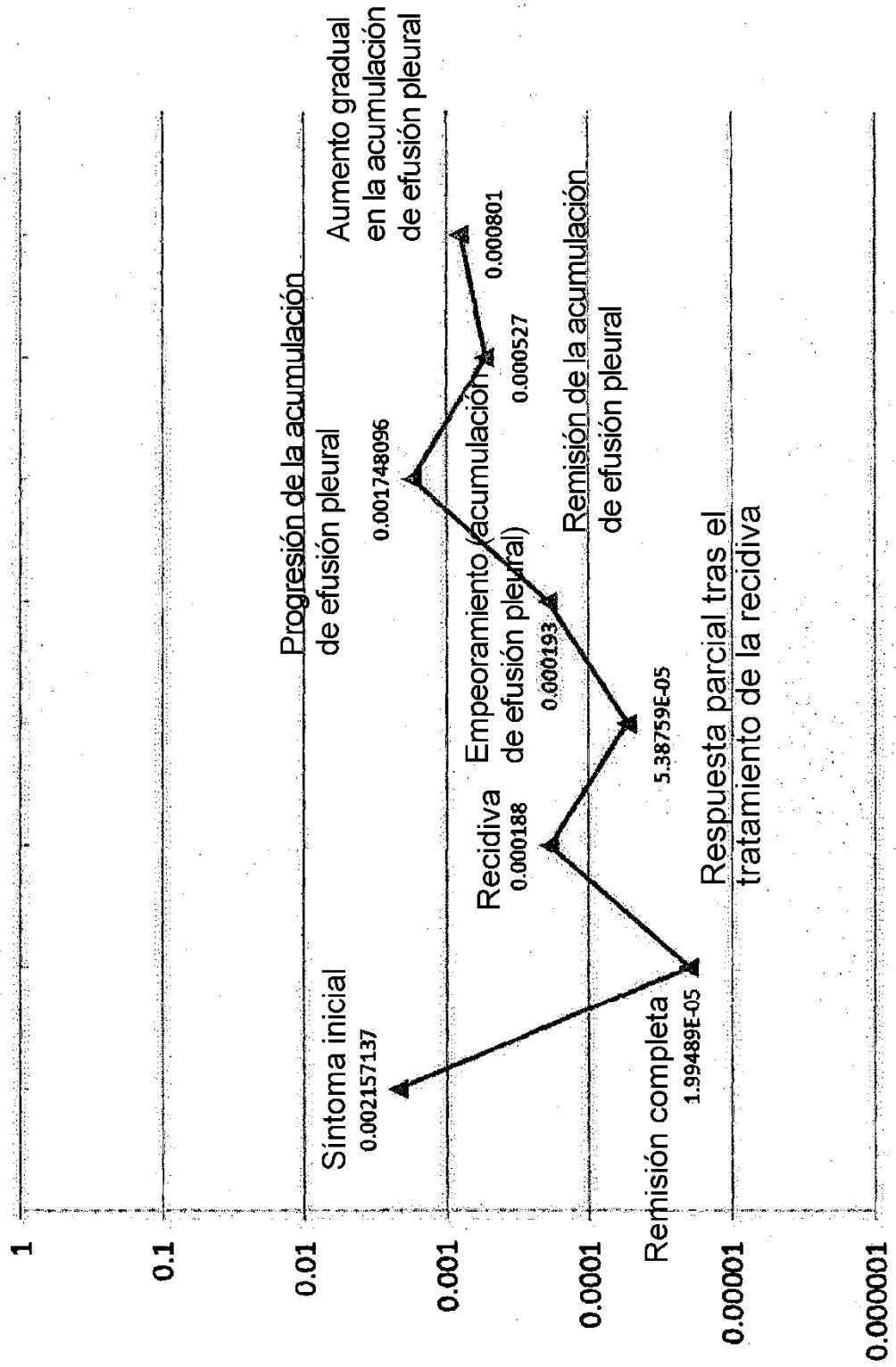


Fig. 11

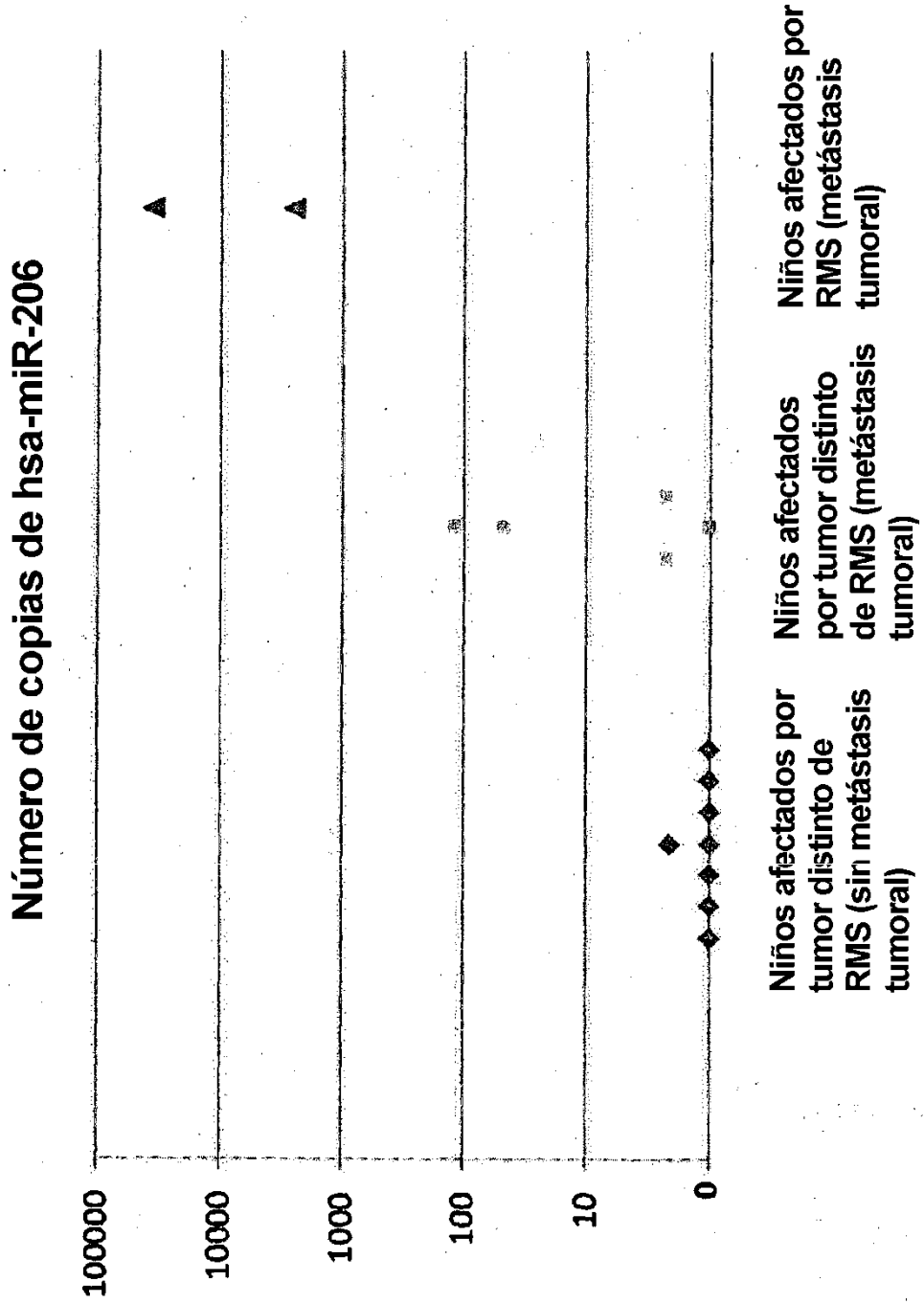


Fig. 12

