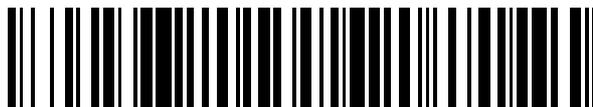


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 262**

21 Número de solicitud: 201431177

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**01.08.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.02.2016**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA "SAN  
VICENTE MÁRTIR" (100.0%)  
C/ Quevedo, nº 2  
46001 Valencia ES**

72 Inventor/es:

**OLTRA GARCÍA, Elisa;  
CERDÁ OLMEDO, Germán;  
MENA DURÁN, Armando Vicente;  
GARCÍA ESCUDERO, María y  
MONSALVE DOLZ, Vicente Juan**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

54 Título: **Método de diagnóstico de fibromialgia basado en microRNAs**

57 Resumen:

Método de diagnóstico de fibromialgia basado en microRNAs. La invención proporciona un método para el diagnóstico molecular de pacientes de fibromialgia, basado en el análisis de la posible alteración de los niveles de determinados microRNAs en células mononucleares de sangre periférica. El método comprende el análisis de los niveles de los microRNAs miR223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145 y el diagnóstico de fibromialgia cuando al menos uno o, preferiblemente, varios de ellos presentan niveles disminuidos respecto a un valor de referencia, que se prefiere que sea el nivel de cada microRNA en individuos sanos. Se proporcionan también tres microRNAs adicionales, miR-21, miR-1260b y miR-1908, que pueden utilizarse como control negativo para confirmar el diagnóstico. El método facilita un diagnóstico objetivo de la fibromialgia, basado en marcadores moleculares que se determinan a partir de una muestra fácil de obtener y procesar como es la sangre.

ES 2 558 262 A1

## DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico de fibromialgia basado en microRNAs

### Campo de la invención

5 La invención se adscribe al sector de los métodos de diagnóstico basado en la detección de los niveles de microRNAs. Concretamente, la invención se refiere a un método de diagnóstico basado en la medición de los niveles de los microRNAs miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y/o miR-145 para el diagnóstico de la enfermedad de fibromialgia.

### Antecedentes de la invención

10 La fibromialgia es una enfermedad que se caracteriza por dolor músculoesquelético generalizado, con una exagerada hipersensibilidad en múltiples puntos predefinidos, sin alteraciones orgánicas demostrables.

15 En ocasiones la fibromialgia se ha relacionado con el Síndrome de Fatiga Crónica, con la que comparte algunas similitudes. Sin embargo y a pesar de que en ocasiones los pacientes que sufren de una, pueden padecer la otra también, se trata de enfermedades claramente diferenciadas por la clasificación de enfermedades de la Organización Mundial de la Salud.

El diagnóstico de fibromialgia actual [Organización Mundial de la Salud (OMS) código M79.0 en el manual de Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD-10)] se basa en un examen clínico de los siguientes ocho síntomas:

- Dificultad para pensar con claridad
- 20 - Irritación de garganta
- Hipersensibilidad de los ganglios linfáticos
- Dolores musculares
- Dolores en las articulaciones
- Dolores de cabeza
- 25 - Alteraciones en el sueño
- Malestar durante más de 24 horas después de haber realizado un esfuerzo

30 Según los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR), una persona padece fibromialgia si presenta un historial de dolor generalizado durante un mínimo de tres meses, así como dolor en 11 o más de las 18 zonas específicas de puntos hipersensibles (áreas del cuerpo que resultan dolorosas cuando se ejerce presión sobre ellas).

En un intento por estandarizar la exploración física realizada por se utilizan también los cuestionarios psicométricos entre los que se encuentran:

- a) Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) o Cuestionario Impacto Fibromialgia (Rivera J, González T, "The Fibromyalgia Impact Questionnaire: a validated Spanish version to assess the health status in women with fibromyalgia", Clin Exp Rheumatol., 2004 Sep-Oct, 22(8):554-60; Burckhardt CS et al., "The fibromyalgia impact questionnaire: development and validation", J Rheumatol. 1991, 18(5):728-33).
- 35 b) Cuestionario Multidimensional de Fatiga (MFI) para la evaluación de fatiga según la Escala de Intensidad de Fatiga (EIF) diseñada por Krupp y colaboradores (Krupp et al., "The fatigue severity scale. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus", Arch Neurol. 1989; 46(10):1121-3).
- 40

- c) Cuestionario de salud y bienestar (SF36) (Ware JE, Jr., Sherbourne CD, "The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection", *Med Care* 1992; 30:473-483; Bullinger M et al, "[SF-36 Health Survey in Rehabilitation Research. Findings from the North German Network for Rehabilitation Research, NVRF, within the rehabilitation research funding program]", *Rehabilitation (Stuttg)*. 2003, 42(4):218-25).

Los métodos de diagnóstico más utilizados a día de hoy se basan en gran medida en criterios con un componente subjetivo importante que lleva en numerosas ocasiones a no tener certeza real acerca de si un paciente padece fibromialgia o no. Además, no son infrecuentes los casos en los que se tardan algunos años en diagnosticar la enfermedad, con el consecuente perjuicio para el paciente.

La carencia de un diagnóstico objetivo, junto con el elevado y creciente número de afectados (2-5% de la población) desencadena frecuentes problemas sociolaborales.

En cuanto a otro tipo de métodos de diagnóstico para la enfermedad de fibromialgia, se ha intentado establecer algún marcador molecular de la enfermedad. Así, forma parte del estado de la técnica una publicación científica en la que se propone un microRNA como marcador de fibromialgia, concretamente el miRNA-145 (Bjersing et al., "Profile of Cerebrospinal microRNAs in Fibromyalgia", *PLOS One* October 25, 2013, DOI: 10.1371/journal.pone.0078762). Dicho análisis se lleva a cabo extrayendo líquido cefalorraquídeo del paciente mediante punción lumbar y análisis de la muestra.

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de RNA monocatenario, habitualmente de unos 20-25 nucleótidos, que tienen la capacidad de regular la expresión de genes específicos mediante su silenciamiento post-transcripcional, gracias a que el miRNA se une al RNA mensajero en una región en la que son complementarios, conduciendo el apareamiento a la degradación del RNA mensajero. Los microRNAs están codificados en el genoma y se forman inicialmente como lo que se conoce como pri-miRNA, que es una molécula larga de RNA bicatenario con capacidad para formar horquillas por complementariedad entre regiones internas de la molécula. El llamado microRNA precursor, pre-miRNA, se forma cuando el pri-miRNA es procesado por la enzima drosha, que acorta o elimina las bases de las horquillas, es decir, los extremos no apareados. El pre-miRNA es transportado del núcleo al citoplasma, donde es fragmentado por la enzima dicer, que lo corta hasta la longitud final de 20-25 nucleótidos, tras lo cual el dúplex resultante se separa dando lugar a dos RNAs monocatenarios, uno de los cuales es el microRNA maduro, que lleva a cabo su acción de silenciamiento integrado en el complejo RISC.

Los microRNAs se suelen denominar mediante el prefijo "mir", seguido de un guión y un número. Es común diferenciar el pre-miRNA de la forma madura mediante mayúsculas, de forma que la abreviatura "mir-" corresponde al pre-miRNA, mientras que la abreviatura "miR-" indica que se habla de un microRNA maduro. A menudo se incluye delante una abreviatura que hace referencia a la especie; así, por ejemplo, "hsa" hace referencia a microRNAs humanos, de *Homo sapiens*.

También pueden encontrarse letras detrás de la numeración (a, b, c...), que indican que dos microRNAs tienen secuencias casi idénticas, difiriendo sólo en uno o dos nucleótidos. Se encuentran también microRNAs cuya abreviatura termina con indicaciones del tipo "-5p" o "-3p", que distinguen los microRNAs que se originan de brazos opuestos (del extremo 5' o del extremo 3') de un mismo pre-miRNA.

Aunque se han establecido criterios para la identificación y denominación de los miRNAs (Ambros V., Bartel B., Bartel D.P., Burge C.B., Carrington J.C., Chen X., Dreyfuss G., Eddy S.R., Griffiths-Jones S., Marshall M., Matzke M., Ruvkun G. Tuschl T., "A uniform system for microRNA annotation", *RNA* 2003 9(3):277-279), los nombres de los microRNAs pueden

modificarse respecto a los inicialmente publicados según se va comprendiendo mejor la relación entre secuencias. Por ello, en las bases de datos dedicadas a microRNAs, puede considerarse que el número de acceso, que es único para cada microRNA, es el único identificador estable para una entrada.

5 Se está investigando sobre la utilidad de algunos miRNAs para el diagnóstico de enfermedades, para diferenciar distintos tipos de cáncer o, incluso, para actuar sobre los mismos. Así, por ejemplo, la familia de la solicitud internacional publicada como WO2012048236 se refiere al uso de microRNAs como biomarcadores para la identificación del cáncer colorrectal familiar y no familiar, mientras la familia de la solicitud WO2013190091 se refiere a microRNAs circulantes como marcadores del cáncer de mama. Por su parte, la patente de EE.UU. US 8173611 se refiere a un método para reducir la proliferación de células cancerosas que comprende introducir en la célula una molécula sintética de RNA bicatenario, en la que una de las cadenas es idéntica a un microRNA maduro seleccionado del grupo de miR-16, miR-96, miR-101, miR-105, miR-124, miR-142, miR-147, miR-206 y miR-346, en donde la cadena complementaria al microRNA maduro contiene una modificación química que incrementa la actividad de la cadena activa. En el caso de la fibromialgia, las pruebas antes citadas, realizadas en líquido cefalorraquídeo, suponen un intento de evaluar posible utilidad de estas moléculas como marcadores de la enfermedad.

Ya que la enfermedad de fibromialgia es una enfermedad con un diagnóstico complejo de realizar, sería muy positivo encontrar algún método de diagnóstico objetivo, seguro y fácil de llevar a cabo y de analizar que facilitara la confirmación del diagnóstico final. Especialmente interesante sería que el diagnóstico fuera de tipo molecular para evitar cualquier tipo de distorsión externa. Particularmente interesante resultaría que la muestra analizada fuera fácilmente obtenible y de fácil manejo en la práctica clínica, además de rápida. La presente invención soluciona este problema.

### Sumario de la invención

La invención se refiere a un método para diagnosticar si un individuo padece la enfermedad de fibromialgia, que comprende las etapas de:

- a) medir el nivel de al menos un microRNA seleccionado del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145, en una muestra de sangre periférica tomada del individuo;
- b) decidir que el paciente padece la enfermedad de fibromialgia si el nivel de al menos uno de los miRNAs analizados del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145 presenta un valor menor que un valor de referencia.

### Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Histograma de intensidad de las señales de los puntos del microarray, tras substracción de ruido de fondo (previa normalización). Eje de abscisas: intensidad de la señal (logaritmo en base 2 de la señal detectada); eje de ordenadas: número de microRNAs. En la leyenda de la parte derecha se indica la relación entre el símbolo de cada curva y la muestra a la que corresponde. Las muestras encabezadas por la letra C corresponden a controles, mientras que las que empiezan por F corresponden a pacientes de fibromialgia.

Fig. 2. "Heatmap" o conjunto de microRNAs analizados por microarray mostrando los microRNAs con diferencias de intensidad marcadas entre pacientes y controles con los que se decidió continuar el estudio. La escala de grises se corresponde con valores de intensidad decrecientes, en escala 0-15, basada en la media de intensidades del microarray, expresada como potencia de 2, y tomando como valor de la escala el exponente de dicha potencia (el logaritmo en base 2). Las zonas representadas con sombreados más oscuros (4) corresponden a valores de intensidad más bajos (0) mientras que las zonas más claras corresponden a

lecturas con valores mayores (15) sobre la mediana de intensidad obtenida tras la normalización global de valores del microarray.

Fig. 3. Diagramas de caja correspondientes a la amplificación de miRNAs por Q-PCR normalizada en pacientes de fibromialgia ("Pacientes") y sujetos control ("Controles"). Los valores se consideran significativos si  $p < 0,05$  (test de la U de Mann-Whitney), lo cual se indica con un asterisco en cada gráfico. Se indica en ordenadas el microRNA al que corresponde cada gráfico, indicando sólo su número y no las posibles precisiones respecto a tejido de expresión o rama del pre-miRNA de la que resulta (hsa-miR-143: hsa-miR-143-3p, hsa-miR-145: hsa-miR-145-5p, hsa-miR-223: hsa-miR-223-3p, hsa-miR-451: hsa-miR-451a, hsa-miR-338: hsa-miR-338-3p, hsa-miR-1908: hsa-miR-1908-5p, hsa-miR-1260: hsa-miR-1260b, hsa-miR-21: hsa-miR-21-5p).

Fig. 4. Gráficos que representan la correlación entre el nivel de fatiga mental (MF, representado en el eje de abscisas) y los niveles de expresión de los microRNAs miR-143 (hsa-miR-143-3p), miR-145 (hsa-miR-145-5p), miR-223 (hsa-miR-223-3p), miR-451 (hsa-miR-451a), miR-338 (hsa-miR-338-3p), miR-21 (hsa-miR-21-5p), miR-1260 (hsa-miR-1260b).

### Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a la obtención de un método de diagnóstico molecular para la enfermedad de fibromialgia.

La invención se basa en un estudio en el que se han medido los niveles de expresión de una serie de microRNAs (miRNAs) en muestras de sangre periférica, comparando los niveles obtenidos en muestras de individuos sanos con muestras de individuos que padecen la enfermedad de fibromialgia. El análisis inicial se realizó con técnicas basadas en la hibridación de extractos de RNA total obtenidos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con secuencias complementarias presentes en microarrays y en la comparación de las señales obtenidas para cada microRNA entre muestras de enfermos de fibromialgia e individuos sanos (sujetos control). Los resultados mostraron una disminución significativa en pacientes de fibromialgia en cinco microRNAs en concreto, resultados que se confirmaron mediante PCR cuantitativa tras transcripción inversa.

En general, se observó que en los pacientes enfermos de fibromialgia, la cantidad de miRNA total es inferior a la de los individuos sanos, detectándose una marcada predominancia de niveles de miRNAs inferiores a los encontrados en los sujetos control. Por ello, para hacer una comparación rigurosa, se ha hecho comparación en base a niveles relativos de miRNA. De esta manera, sorprendentemente, al realizar el análisis de los datos, se ha observado que los niveles de expresión de miRNAs en los pacientes están significativamente reducidos con respecto a los de individuos sanos en el caso de unos miRNAs en particular, concretamente los miRNAs miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145. Por tanto, siendo del todo inesperado que concretamente fuera este grupo de miRNAs los que tuvieran una especial relevancia en el diagnóstico de la enfermedad de fibromialgia y tratándose de los miRNAs que presentaban diferencias más acentuadas en sus niveles de inhibición con respecto a los controles sanos, se seleccionan para establecer un método objetivo de diagnóstico para dicha enfermedad.

El método de diagnóstico de la invención comprende la medición de los niveles de al menos uno de los miRNA del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145, preferiblemente en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) del paciente.

Para la presente invención se entiende por microRNA (miRNA) cuyo nivel se mide el correspondiente miRNA maduro. De hecho, como se discute más adelante, las condiciones de algunos de los ensayos descritos en la presente solicitud, como la cuantificación mediante qPCR, han sido diseñados por medir específicamente miRNAs maduros, y no los posibles pri-

miRNA en todas sus formas y conformaciones y los pre-miRNA en todas sus formas y conformaciones que puedan coexistir en una misma célula junto con el correspondiente miRNA, formando parte del mismo proceso biológico.

5 En cambio, se consideran sinónimos entre sí a las palabras microchip, microarray, oligoarray y oligochip, pudiendo utilizarse indistintamente a lo largo de la presente invención. Se entiende como microchip una superficie sólida de pequeño tamaño, por ejemplo un portaobjetos, que actúa como soporte al cual está unida una colección ordenada de fragmentos de DNA o RNA, cada uno de los cuales está identificado, conociéndose su naturaleza y su ubicación concreta en el microchip respecto a los otros miembros de la colección.

10 El método de la invención supone una clara ventaja con respecto al estado de la técnica actual por varias razones. En primer lugar, actualmente la manera más común de diagnosticar la enfermedad de fibromialgia es mediante un examen físico realizado por personal sanitario en el que se comprueba si existe dolor de forma continuada en distintos puntos concretos del cuerpo. Si existen una serie de puntos corporales concretos (especificados en el apartado de  
15 antecedentes de la invención) en los que el paciente se ve aquejado de dolores como consecuencia de una presión determinada, es diagnosticado con la enfermedad de fibromialgia. Resulta plausible que el estado del paciente pueda variar de una exploración a otra, o que pueda variar entre pacientes por una tolerancia diferente al dolor. Así, por ejemplo un paciente con una tolerancia al dolor más alta podría por error no ser diagnosticado de  
20 fibromialgia padeciendo la misma. En cambio, el método de la presente invención facilita el diagnóstico objetivable de una enfermedad crónica de alta prevalencia en países desarrollados (2,4% de la población general mayor de 20 años), asociada a incapacidad laboral.

En segundo lugar, el estudio publicado en la revista PLOS ONE (Bjersing et al.), aunque apunta un posible biomarcador de la enfermedad, no soluciona el problema del diagnóstico de  
25 fibromialgia fácilmente automatizable en la práctica clínica. El tejido en el que se hacen los análisis es líquido cefalorraquídeo, siendo imprescindible su extracción previa. De cara a la extracción previa de dicho líquido es necesario que el paciente asuma el riesgo existente de someterse a la intervención de una punción lumbar. Entre otros riesgos, el paciente puede sufrir: sangrado en el conducto raquídeo, molestia durante el examen, dolor de cabeza  
30 después del examen, reacción de hipersensibilidad (reacción alérgica) al anestésico, infección introducida por la aguja al penetrar la piel, etc. Así mismo el lugar de la intervención debe ser un espacio debidamente acondicionado para tal fin, estéril y con los medios y el personal adecuado para realizarlo con un mínimo de seguridad para el paciente. Dichos medios resultan mucho más difíciles de obtener debido principalmente al coste que tienen. El origen de la  
35 muestra obtenida en la presente invención tiene muchas menos complicaciones que la de líquido cefalorraquídeo.

Por último, que los niveles de un miRNA varíen en líquido cefalorraquídeo en pacientes que padecen la enfermedad de fibromialgia no hace esperable en ningún caso que en una muestra completamente diferente como son las PBMCs pudieran existir también variaciones en algún  
40 marcador molecular relacionadas con la enfermedad. Al igual que ocurre con el nivel de expresión génica, los niveles de los miRNAs tienen una variación muy alta de unos tejidos a otros siendo muy plausible que los niveles varíen entre los tejidos, sin hacer en ningún caso esperable que dicha variación se mantenga entre tejidos y siendo difícil deducir qué miRNAs pueden estar alterados en cada tejido.

45 Seguía sin existir, hasta la presente invención, una forma de diagnosticar la enfermedad de fibromialgia de manera objetiva, sin riesgo y sin generar esa duda razonable que inspira el testimonio subjetivo del paciente a raíz de un examen clínico físico.

La presente invención supone una solución frente a esa falta de certeza del método actual más utilizado, al poder ser utilizado para confirmar el diagnóstico de la enfermedad. El análisis de  
50 moléculas biológicas es un método fácil de estandarizar al existir una medición de los niveles

de expresión de miRNA específicos y que aporta un componente empírico y objetivo que no se ve influido por la opinión del paciente en un momento concreto. El diagnóstico molecular basado en la medición de los niveles de una serie de miRNAs aporta esa seguridad y fiabilidad de la que carece el método actual de diagnóstico. Es un método que puede ser reproducido en las mismas condiciones con una expectativa alta de que los resultados obtenidos, la interpretación de los mismos y el correspondiente diagnóstico apenas varíen. Es un método completamente independiente de la opinión del paciente y de las circunstancias que puedan rodear al momento del examen médico, aumentando el grado de objetividad del diagnóstico.

Además, el hecho concreto de que las moléculas analizadas sean miRNAs supone una ventaja respecto a otros tipos de RNAs, pues presentan una estabilidad mayor que estos últimos, lo que da lugar a un menor riesgo de variabilidad incluso en muestras almacenadas a distintos tiempos tras su obtención (Mraz M, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S., "MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples", *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Dec 4;390(1):1-4. doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.061, Epub 2009 Sep 19, Rev.. PubMed PMID: 19769940; Jung M, Schaefer A, Steiner I, Kempkensteffen C, Stephan C, Erbersdobler A, Jung K., "Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples", *Clin Chem.* 2010 Jun;56(6):998-1006. doi:10.1373/clinchem.2009.141580. Epub 2010 Apr 8. PubMed PMID: 20378769).

Por otro lado, la facilidad de obtención de la muestra también supone una ventaja importante de la invención. La extracción, almacenamiento y procesado de sangre del paciente es una técnica cotidiana a la orden día en un contexto médico por lo que esa sencillez en cuanto a la obtención, almacenamiento y procesamiento de la muestra también es ventajosa tanto para el personal sanitario como para el paciente.

Otra de las ventajas de la invención es que a partir de los resultados del método de diagnóstico junto con el examen médico, se puede tratar al paciente enfermo ya diagnosticado de la forma más adecuada en función de su estado de salud. Por tanto, el aumento en la certeza del diagnóstico, disminuye de manera muy notable el riesgo de errar en el diagnóstico clínico y de no aplicar al paciente el tratamiento más eficaz.

Por tanto la invención se refiere a un método para diagnosticar si un individuo padece la enfermedad de Fibromialgia, que comprende las etapas de:

- a) medir el nivel de al menos un microRNA seleccionado del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145, en una muestra de sangre periférica tomada del individuo;
- b) decidir que el paciente padece la enfermedad de fibromialgia si el nivel de al menos uno de los miRNAs analizados del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145 presenta un valor menor que un valor de referencia.

En el método de la invención se propone medir al menos uno de los miRNAs del grupo citado para tener un diagnóstico de la enfermedad de fibromialgia. Como puede verse en los resultados de los ensayos que se presentan más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud, cada uno de los miRNAs seleccionados, de forma independiente, permite diagnosticar enfermos de fibromialgia. Sin embargo, el análisis de un único miRNA en PBMCs no permite diagnosticar a todos los pacientes incluidos en el presente estudio. Esto no es sorprendente, pues la fibromialgia es una enfermedad con un cuadro clínico variable y, además, los pacientes incluidos en el estudio en el que se basa la invención dieron lugar a puntuaciones (*scores*) variables en los formularios utilizados para comprobar su diagnóstico (FIQ, MFI y SF-36, como se especifica más adelante). Por ello, se prefiere que el método de diagnóstico de la fibromialgia de la presente invención se base en la observación de la alteración de los niveles de un grupo de miRNAs; así, son realizaciones preferidas de la presente invención aquellas en

las que el diagnóstico se basa en el análisis de la alteración de combinaciones (de al menos dos) de los miRNAs del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145.

Se prefiere en la presente invención que al menos uno de los miRNA medidos sea el miRNA-223 o miRNA-451 ya que, tal y como se observa más adelante en la Tabla 5, todos los pacientes que sufren la enfermedad muestran una disminución en los niveles de expresión de al menos uno de estos dos miRNAs. Por tanto, a la hora de medir un solo miRNA, será más conveniente que este sea uno de los dos que más disminución presente en pacientes enfermos para así tener mayor seguridad en el diagnóstico. Más preferiblemente, se miden los dos y, si al menos uno de ellos es menor que su correspondiente valor de referencia, se determina que el paciente tiene fibromialgia.

En otra realización preferida de la presente invención, la medición se realiza en al menos 4 de los 5 miRNAs ya que, al medir un mayor número de miRNAs se aumenta de forma considerable la seguridad en cuanto al resultado que se obtiene de la medición, lo cual es especialmente importante en una enfermedad con sintomatología compleja e, incluso, heterogénea, como es la fibromialgia. En el caso anterior, en el que se miden 4 de los 5 miRNAs, es preferible que el miRNAs que no esté incluido en la medida sea el miR-143 o el miR-145. En este caso particular de los miRNAs miR-143 y miR-145, ha de destacarse que pertenecen a un mismo cluster y que por tanto están co-transcritos y regulados a nivel transcripcional por los mismos factores. Resulta interesante tal y como se muestra posteriormente en las Tablas 4 y 5 de los Ejemplos, que los resultados obtenidos en el análisis de ambos resulta muy similar. Por este motivo, en el caso de no hacer el análisis de alguno de los miRNAs se prefiere que sea uno de los dos miRNA mencionados, miR-143 o miR-145, ya que sabiendo los niveles de expresión de uno de ellos, resulta relativamente fácil de estimar una variación parecida para el otro.

En una realización de la invención todavía más preferible, se miden los niveles de los cinco miRNA propuestos con el fin de obtener unos resultados que garanticen la máxima seguridad y sensibilidad para el diagnóstico de la enfermedad de fibromialgia.

La decisión acerca de si el paciente padece la enfermedad de fibromialgia o no, es preferible que se tome en base a que varios miRNAs muestren un nivel menor que su correspondiente valor de referencia. De esta forma, como se ha comentado, en la presente invención se prefiere que se determine el nivel de al menos dos miRNAs del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145 y, más preferiblemente, al menos cuatro miRNAs; especialmente en este segundo caso, se prefiere que se establezca que un paciente padece la enfermedad de fibromialgia si el nivel de al menos dos de los miRNAs analizados presenta un valor menor que su correspondiente valor de referencia. En un análisis especialmente riguroso, puede establecerse también que un paciente es considerado enfermo de fibromialgia si el nivel de al menos tres o, incluso, al menos cuatro de los cinco miRNAs presenta un valor menor que su correspondiente valor de referencia.

Para poder establecer una comparación rigurosa entre los niveles relativos de miRNAs medidos de pacientes que padecen la enfermedad de fibromialgia y los sujetos control es imprescindible establecer un valor de referencia o valor control con el que comparar los niveles de los miRNA de las muestras medidas. Tal como se utiliza en la presente solicitud, se entienden como sinónimos los términos valor de referencia y valor control. Dicho valor control se puede obtener de diversas maneras, por ejemplo a partir de estudios previos que pueden ser comparación de casos y controles. Preferiblemente en la presente invención se considera que el valor de referencia es el valor medio de los niveles de expresión de dicho miRNA obtenido en un estudio estadístico en individuos sanos. Concretamente, para los efectos de la presente invención se prefiere que un miRNA se considere que tiene un valor menor que el valor de referencia cuando el valor de su nivel de expresión es la mitad o está por debajo de la mitad de los niveles medios de expresión en individuos sanos (ver Tablas 4 y 5 más adelante).

Además, la determinación del nivel medio de expresión de cada miRNA determinado, se podría realizar utilizando cualquier método conocido y disponible para un experto en la materia, por ejemplo, calculando la media aritmética, aunque en los Ejemplos de la presente invención se han calculado por comparación de medias de los duplicados válidos obtenidos en referencia a su valor medio experimental en un estudio de hibridación con sondas complementarias que forman parte de un microarray.

En aquellos casos en que se necesite que el método de diagnóstico sea especialmente riguroso puede establecerse también que un miRNA tiene un valor menor que su valor de referencia cuando su nivel de expresión está al menos cuatro veces por debajo del valor de referencia. También puede elegirse como valor de referencia otros valores, como por ejemplo el valor del percentil 75 de los niveles de los miRNAs de individuos sanos. Ese tipo de opciones puede dar lugar a un diagnóstico más seguro de los pacientes, pero también pueden conllevar que queden sin diagnosticar algunos de los individuos que padezcan fibromialgia. Es compatible también con la presente invención que el valor de referencia sea el nivel de alguna otra molécula que no sea necesariamente uno de los cinco miRNAs analizados. Todas esas posibilidades quedan comprendidas dentro del alcance del método de la presente invención.

Adicionalmente, para mayor fiabilidad se prefiere que la prueba diagnóstica incluya además los niveles de al menos uno de los miRNAs miR-21, miR-1260b y miR-1908, como control negativo, comprobando que dicho nivel no sea menor que su correspondiente valor de referencia. En una situación aún más preferible, se miden los niveles de al menos dos de los miRNAs hsa-miR-21, hsa-miR-1260b y hsa-miR-1908 aumentando de esta forma aún más la seguridad de los resultados y su rigurosidad. En una situación de aún mayor preferencia, se prefiere medir los niveles de expresión de los tres miRNAs miR-21, miR-1260b y hsa-miR-1908, verificando que al menos dos de ellos no presenten un valor menor que su correspondiente valor de referencia, para asegurar con mayor certeza la fiabilidad del método diagnóstico de la presente invención. Es también compatible con la invención que se determine el nivel de los tres miRNAs miR-21, miR-1260b y hsa-miR-1908 y se establezca de ninguno de los tres debe presentar un valor menor que su correspondiente valor de referencia para establecer que un paciente padece fibromialgia.

En realizaciones preferidas de la invención, los criterios preferidos respecto a su correspondiente valor de referencia y las circunstancias en las que el nivel de un miRNA del grupo de miR-21, miR-1260b y miR-1908 es considerado menor que su valor de referencia son los mismos que los ya comentados para los microRNAs del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145, es decir: el valor de referencia será preferiblemente el nivel medio de expresión ese microRNA en individuos sanos y se considerará que el microRNA presenta un valor menor que ese valor de referencia cuando el valor detectado en una muestra sea al menos dos veces inferior (la mitad o menos de la mitad) que su correspondiente valor de referencia. Así, se considera que el nivel de expresión no varía en estos miRNAs cuando la disminución del nivel esté por encima de la mitad con respecto al valor de referencia de los pacientes sanos.

La elección de estos microRNAs como controles negativos se debe a que los niveles de expresión de los miRNAs miR-1260b y miR-1908 no muestran una variación menor que el valor de referencia al ser comparados los niveles de expresión de los miRNAs de individuos sanos y los de los pacientes enfermos de fibromialgia (ver Tabla 4 de los Ejemplos); en el caso de miR-21, los niveles observados en pacientes son inferiores a la mitad de los observados en los controles cuando los ensayos se realizan con microarrays, pero su disminución no resultó ser significativa en los ensayos de qPCR. Verificar la no disminución de los niveles de estos microRNAs para diagnosticar que un paciente padece fibromialgia, resulta una ventaja importante, ya que actúa como control negativo del método de diagnóstico en la invención, aumentando así el rigor del método. Preferiblemente, el método diagnóstico que incluya la determinación de estos microRNAs debe incluir también criterios que contemplen la posible

heterogeneidad de los enfermos de fibromialgia también en el control negativo del ensayo. Como puede verse en los Ejemplos que se presentan más adelante, los miRNAs miR-1260b y miR-1908 suponen controles negativos más restrictivos (presentan globalmente menos inhibición) que el miR-21; sin embargo, la inclusión del miR-21 en el análisis facilita asegurar el diagnóstico de pacientes como el que se denomina más adelante "FM9", en el que el miR-1260b presenta una disminución de valor superior a 2 (disminuye más de la mitad) con respecto a los valores en individuos sanos, pero la disminución de los microRNAs miR-1908 y miR-21 presenta un valor inferior a 2.

Por tanto, para tener la certeza de que el paciente sufre la enfermedad de fibromialgia, se prefiere que se lleve a cabo el método de la presente invención de manera que se diagnostique fibromialgia cuando el paciente se cumpla alguno de los posibles criterios antes expuestos, referidos a la medida y variación de los cinco miRNAs del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145 y, preferiblemente, debe cumplirse también que al menos uno de los microRNAs del grupo hsa-miR-21, hsa-miR-1260b y hsa-miR-1908 no sea menor que su correspondiente valor de referencia, tal y como se discute en el párrafo anterior.

En una realización específica de la anterior, por la que se tiene especial preferencia, el método de la presente invención comprende:

- a) medir el nivel de al menos
  - i) cuatro microRNAs seleccionados del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145, preferiblemente siendo el microRNA no incluido en la medida miR-143 o miR-145,
  - ii) los tres microRNAs del grupo de miR-21, miR-1260b y miR-1908;
- b) decidir que el paciente padece la enfermedad de fibromialgia si
  - i) al menos dos de los microRNAs analizados del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145 presentan un valor menor que su correspondiente valor de referencia, y
  - ii) al menos dos de los microRNAs analizados del grupo de miR-21, miR-1260b y miR-1908 no presentan un valor menor que su correspondiente valor de referencia.

Con esta realización adicional del método se introduce un control negativo que permite asegurarse de los que los resultados obtenidos son fiables y de que se ha llevado a cabo una realización del método adecuada y en buenas condiciones.

En la presente invención se tiene preferencia por realizar la medición de los niveles de los miRNA partiendo de muestras de sangre. Concretamente, se prefiere realizar el método de la invención en células mononucleares de sangre periférica, ya que son relativamente fáciles de aislar y analizar. La muestra es fácilmente extraíble, lo que la hace especialmente interesante de cara a diagnosticar clínicamente en un tiempo prudente y sin causar demasiados perjuicios al paciente. Los métodos de aislamiento de las PBMCs son perfectamente conocidos por los expertos en la materia y están generalmente basados en recoger la muestra de sangre periférica en un tubo que contiene un anticoagulante, tal como heparina o sales de EDTA, y en la separación por centrifugación en gradiente de densidad de la fracción correspondiente a los glóbulos rojos (parte inferior del tubo), la capa o anillo de linfocitos y plaquetas (fase intermedia blanquecina, también conocida como "*buffy coat*") y la capa correspondiente al plasma (fase líquida superior), tal como se describe en el Ejemplo 1 de la presente invención.

La determinación de los niveles de cada miRNA a analizar en las PBMCs puede realizarse a partir de RNA total aislado de las mismas, como en los Ejemplos de la presente solicitud, o tras

efectuar un enriquecimiento en microRNAs con cualquiera de las técnicas conocidas como, por ejemplo, enriquecimiento mediante purificación de RNAs de pequeño tamaño a partir de RNA total, por columnas de unión preferente de ácidos nucleicos de pequeño tamaño u otros métodos alternativos, tal como indican los manuales de los productos miRVana miRNA isolation kit (LifeTechnologies: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/AM1560>), miRNEasy kit (Qiagen: <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/rna-sample-technologies/mirna/mirneasy-mini-kit>), u otros conocidos por los expertos en la técnica (Eikmans M, Rekers NV, Anholts JD, Heidt S, Claas FH, "Blood cell mRNAs and microRNAs: optimized protocols for extraction and preservation", Blood. 2013 Mar 14;121(11):e81-9. doi: 10.1182/blood-2012-06-438887. Epub 2013 Jan 17. PubMed PMID: 23327925 ).

Como se comenta más adelante, la adaptación de técnicas tradicionales, como la hibridación *in situ*, al análisis de miRNAs, posibilita también que no sea necesario el aislamiento de RNAs de las PBMCs para llevar a cabo la cuantificación de miRNAs.

A la hora de detectar el nivel del miRNA, puede recurrirse a cualquiera de las técnicas conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, puede recurrirse a técnicas basadas en el apareamiento de los miRNAs con secuencias complementarias y la cuantificación del miRNA asociado a las mismas, o también mediante la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) previamente a la actuación de la polimerasa inversa. En el primer caso, las opciones son múltiples y bien conocidas, ya que la detección de los niveles de miRNAs asociados a sus correspondientes secuencias complementarias admite multitud de variantes, tal como el apareamiento con secuencias complementarias que forman parte de un microchip y detección y evaluación de la correspondiente señal, preferiblemente habiendo marcado previamente los miRNAs presentes en la muestra a analizar y detectando y cuantificando la señal que queda asociada a una determinada posición del microchip, lo que permite también identificar a dicho miRNA, de forma análoga al ensayo descrito en el Ejemplo 1 de la presente solicitud. El marcaje del miRNA puede hacerse de cualquier forma conocida por el experto en la materia, como por ejemplo con radiactividad o con algún compuesto que emita fluorescencia, como en el citado Ejemplo. Tal como se comentó previamente, es especialmente significativo que, en el ensayo que se describe en el Ejemplo 1 de la presente solicitud, la diferencia entre los niveles detectados de los pacientes y de los individuos sanos (valor de referencia) con la técnica de detección de miRNAs asociados a su correspondiente secuencia complementaria sobre un microchip es como mínimo de cuatro veces e, incluso, de al menos seis veces, para cualquiera de los miRNAs del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145.

También es compatible con la presente invención que sea la secuencia complementaria la que esté marcada mediante cualquier método de marcaje conocido, como suele suceder cuando se utilizan las llamadas "sondas" (moléculas de ácido nucleico con secuencia complementaria a al menos un fragmento de otro ácido nucleico que se desea detectar) y se determine el nivel de miRNAs a partir de la señal emitida por la secuencia complementaria que ha quedado unida al mismo; habitualmente, o la sonda o los microRNAs presentes en la muestra a analizar han sido previamente inmovilizados sobre un soporte, que puede ser de muy diversa naturaleza (membranas poliméricas como puede ser nylon o nitrocelulosa, polímeros a los que se ha dado forma de placa multipocillo, vidrio como en el caso de los microchips convencionales...), aunque el apareamiento entre sonda y microRNA puede darse igualmente con ambas formas en solución o suspensión y retirada de los híbridos no apareados o aislamiento de los híbridos sonda-microRNA antes de proceder a la detección y cuantificación de la señal.

Así, además de los microchips, puede utilizarse también cualquier otra técnica basada en la asociación de los miRNAs con secuencias complementarias, para cuya aplicación existen muchos *kits*, protocolos y equipos especialmente diseñados para las mismas comercialmente disponibles. Así, por ejemplo, puede citarse SmartRNAplex® (MERCK), basado en partículas

que contienen sondas específicas para miRNAs determinadas, y asociado a una técnica en la que la determinación de los niveles de miRNAs se realiza en un citómetro de flujo.

También puede recurrirse a técnicas de detección de miRNAs alternativas como el llamado "splinted ligation method" (método de ligación entablillada), (Nilsen TW, "Splinted ligation method to detect small RNAs", Cold Spring Harb Protoc. 2013 Jan 1;2013(1), pii: pdb.prot072611, doi: 10.1101/pdb.prot072611.PubMed PMID:23282636), diseñado para la detección de RNAs pequeños, que está basado en la unión del grupo 5' marcado de la molécula de RNA a una cadena de DNA gracias a la ligasa de T4 y a una "tablilla" u oligonucleótido "puente complementario a los dos, y en la posterior detección de la molécula marcada tras electroforesis, así como técnicas similares a esta.

La detección y cuantificación de los microRNAs puede hacerse también mediante otras técnicas tradicionales que no requieren su aislamiento de la muestra en la que están presentes y en la que se quieren detectar, como hibridación *in situ* (R, Ro S, Yan W., "In situ hybridization detection of microRNAs", Methods Mol Biol. 2010;629:287-94, doi: 10.1007/978-1-60761-657-3\_18, PubMed PMID: 20387156; PubMed Central PMCID: PMC3062509), inmunodetección, u otras similares.

Otra realización, que está incluida en el alcance de la presente invención como las anteriormente mencionadas, es la cuantificación de los niveles de los miRNAs mediada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando la variante conocida como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (a la que se alude de forma abreviada como qPCR, RT-PCR ó qRT-PCR), que se llevará a cabo preferiblemente tras efectuar la transcripción inversa de los RNAs (o, al menos, de los microRNAs de interés) presentes en la muestra a analizar. Una posible realización específica, adecuada para los propósitos de la presente invención, es llevar a cabo la qPCR sobre los cDNAs generados por transcripción inversa utilizando como cebadores directos ("*forward primers*") los oligonucleótidos de la Tabla 7, como en el Ejemplo 2 de la presente solicitud. Dichos cebadores directos han sido específicamente diseñados para el método de la presente invención de manera que, entre otras ventajas, puede llevarse a cabo el análisis conjunto de todos los miRNAs de interés para la presente invención y se asegura que, en cada caso, el miRNA cuantificado es el miRNA maduro. Alternativamente, pueden utilizarse otros cebadores directos, que pueden diseñarse siguiendo criterios específicos o seleccionarse entre los cebadores comercialmente disponibles como, por ejemplo, los disponibles para los miScript Primer Assays para la cuantificación de miRNA utilizando el sistema miScript PCR System, de Qiagen (<http://www.qiagen.com/products/catalog/assay-technologies/mirna/miscript-primer-assays>), lo que facilita su combinación con el mismo cebador inverso universal utilizado en los ensayos de la presente solicitud, provisto igualmente por Qiagen.

La técnica de pPCR se puede utilizar de forma independiente o también con el objetivo de comprobar y asegurar los niveles de miRNAs obtenidos por un análisis con un microchip/microarray, aumentando así la sensibilidad y el rigor de los resultados. Es especialmente significativo que, en los Ejemplos de la presente solicitud, la diferencia entre los niveles detectados de los pacientes y de los individuos sanos (valor de referencia) con esta técnica de qPCR es menor que con la técnica del microchip por lo que, cuando los niveles de los miRNAs se determinen utilizando qPCR y el valor de referencia para cada miRNA sea la media del nivel del mismo en individuos sanos, se preferirá establecer que una disminución de al menos dos veces del nivel en la muestra analizada con respecto al valor de referencia sea suficiente para establecer que el nivel de un miRNA es menor que su correspondiente valor de referencia.

Alternativamente, puede recurrirse a una realización adicional, que consiste en la detección indirecta de los miRNAs basándose en la alteración de la expresión de sus genes dianas, bien por cuantificación de los RNAs mensajeros de dichos genes o la de las proteínas que codifican:

la disminución de los niveles de un miRNA debería implicar una menor degradación de los RNAs mensajeros que son su diana, lo que debería resultar en niveles incrementados de las correspondientes proteínas. También podría recurrirse a los factores de transcripción mediadores de la transcripción y, por tanto, de la expresión de los miRNAs.

- 5 En la actualidad existen distintos programas desarrollados para predecir genes diana de miRNAs, tales como la herramienta TargerMiner, disponible en [www.isical.ac.in/~bioinfo\\_miu](http://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu) (Bandyopadhyay S, Mitra R, "TargetMiner: microRNA target prediction with systematic identification of tissue-specific negative examples", *Bioinformatics*. 2009 Oct 15;25(20):2625-31, doi: 10.1093/bioinformatics/btp503. Epub 2009 Aug 19. PubMed PMID: 19692556); la
- 10 herramienta PICTAR-VERT, disponible en <http://pictar.mdc-berlin.de/> (Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N, "Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005 May;37(5):495-500. Epub 2005 Apr 3. PubMed PMID: 15806104), o la herramienta COMIR, disponible en <http://www.benoslab.pitt.edu/comir/> (Coronello C, Benos PV., "ComiR: Combinatorial microRNA target prediction tool", *Nucleic Acids Res*. 2013 Jul;41(Web Server issue):W159-64. doi: 10.1093/nar/gkt379, Epub 2013 May 22, PubMed PMID: 23703208; PubMed Central PMCID: 15806104). En cualquier caso, si se recurriera a esta alternativa, es recomendable validar
- 15 experimentalmente los transcritos diana potenciales en el tipo celular de interés debido, entre otros motivos a la falta de complementariedad absoluta entre las secuencias de los miRNAs de
- 20 animales y las de sus correspondientes dianas y a otros factores específicos de tejido o tipo celular.

Como ya se comentó, para los efectos de la presente invención se tiene en cuenta la variación de los niveles de un miRNA cuando dichos niveles se ven reducidos en al menos dos veces con respecto al valor de referencia o valor control de individuos sanos. En casos donde se

25 necesite un criterio más restrictivo, se tendrá en cuenta la variación de los niveles del miRNA cuando dichos niveles se vean reducidos en al menos cuatro veces con respecto al valor de referencia o valor control de individuos sanos. En casos donde se necesite un criterio aún más restrictivo, se tendrá en cuenta la variación de los niveles del miRNA cuando dichos niveles se vean reducidos en al menos seis veces con respecto al valor de referencia o valor control de

30 individuos sanos. A la hora de establecer el valor mínimo de variación que debe observarse, es importante tener en cuenta no sólo lo riguroso que se desea que sea el diagnóstico, sino también la técnica empleada para determinar los niveles de los miRNAs, para que el valor establecido sea compatible con las diferencias que la misma permite observar.

El individuo sobre el que se lleva a cabo el diagnóstico es preferiblemente un ser humano. En

35 ese caso, los miRNAs entre los cuales se seleccionarán para su medida el marcador o los marcadores cuya disminución en un cierto grado (según las distintas realizaciones) con respecto a su correspondiente valor de referencia será indicativa de fibromialgia, así como los posibles controles opcionales utilizados para confirmar el diagnóstico, serán los correspondientes miRNAs humanos, concretamente los que en la actualidad reciben las

40 denominaciones hsa-miR-223-3p (miR-223), hsa-miR-451a (miR-451), hsa-miR-338-3p (miR-338), hsa-miR-143-3p (miR-143), hsa-miR-145-5p (miR-145), hsa-miR-21-5p (miR-21), hsa-miR-1908-5p (miR-1908), hsa-miR-1260b (miR-1260b), que son los miRNAs analizados en los Ejemplos de la presente invención.

Las denominaciones de algunos miRNAs han ido cambiando a lo largo del tiempo,. Así, por

45 ejemplo, las denominaciones presentes en la base de datos correspondiente al microarray utilizado en el Ejemplo 1 no se corresponden, en algunos casos, con las denominaciones actuales, habiendo pequeñas variaciones en la indicación sobre el brazo de la horquilla del que proceden. Se ha considerado como la denominación "actual" de los miRNAs humanos analizados en los Ejemplos de la presente solicitud la que figura como identificación de los

50 mismos en la versión actual de la base de datos "miRBase" (<http://www.mirbase.org/>, Versión 21, de junio de 2014). Pero las entradas correspondientes a cada miRNA en dicha base de

5 datos contienen también la denominación anterior recibida por dicho miRNA, que es la que se puede encontrar en muchas publicaciones. Así, por razones de claridad, en la Tabla siguiente se indica la nomenclatura actual de cada uno de los miRNAs analizados en los Ejemplos de la presente solicitud, su denominación anterior, la denominación que les correspondía según la base de datos del proveedor del microarray en el momento de realización de los ensayos, la secuencia de cada uno de los miRNAs humanos, su número de acceso en la base de datos "miRBase", así como el número de secuencia con el que aparecen en el listado de secuencias de la presente solicitud.:

Tabla 1.- MicroRNAs humanos analizados: secuencia y número de acceso a la misma

Nombre del MicroRNA	Nombre anterior	Nombre en microarray	Nº acceso miRBase	Secuencia del miRNA maduro	SEQ ID NO:
hsa-miR-223-3p	hsa-miR-223	hsa-miR-223	MIMAT0000280	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	1
hsa-miR-451a	hsa-miR-451	hsa-miR-451	MIMAT0001631	AAACCGUUACCAUACUGAGUU	2
hsa-miR-338-3p	hsa-miR-338	hsa-miR-338-3p	MIMAT0000763	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG	3
hsa-miR-143-3p	hsa-miR-143	hsa-miR-143	MIMAT0000435	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	4
hsa-miR-145-5p	hsa-miR-145	hsa-miR-145	MIMAT0000437	GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU	5
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-21	hsa-miR-21p	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	6
hsa-miR-1908-5p	hsa-miR-1908	hsa-miR-1908	MIMAT0007881	CGGCGGGGACGGCGAUUGGUC	7
hsa-miR-1260b	hsa-miR-1260b	hsa-miR-1260b	MIMAT0015041	AUCCACCACUGCCACCAU	8

10 Así, las pruebas para su determinación se diseñarán teniendo en cuenta las secuencias de los miRNA, que pueden consultarse también en las diferentes bases de datos en las que están disponibles, tales como: la "micro-RNA Target Collection" del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (<http://cbio.mskcc.org/mirnaviewer/>), que permite también consultas sobre dianas de miRNAs humanos: <http://cbio.mskcc.org/miRNA2003/mammalian/index.html>), "miRecords" ([www.biobase.org](http://www.biobase.org)) y, muy especialmente, la base de datos del Wellcome Trust Sanger Institute "miRBase" (<http://www.mirbase.org/>) ya citada anteriormente, en cuyo contenido están basados los ensayos llevados a cabo en los Ejemplos de la presente solicitud.

20 En una realización preferida de la invención, cuando el individuo sobre el cual se realiza el diagnóstico es un ser humano y la determinación del nivel de los microRNAs seleccionados se realiza mediante PCR cuantitativa con retrotranscripción (transcripción inversa) previa, los cebadores directos de la PCR cuantitativa se seleccionarán del grupo de: SEQ ID NO:9 (para hsa-miR-223-3p), SEQ ID NO:10 (para hsa-miR-451a), SEQ ID NO:11 (para hsa-miR-338-3p),

SEQ ID NO:12 (para hsa-miR-143-3p), SEQ ID NO:13 (para hsa-miR-145-5p), SEQ ID NO:14 (para hsa-miR-21-5p), SEQ ID NO:15 (hsa-miR-1908-5p), SEQ ID NO:16 (para hsa-miR-1260b)

5 En cualquiera de las realizaciones anteriores o, más preferiblemente, en conexión con cualquiera de las realizaciones en las que se mide el nivel de al menos cuatro de los miRNAs seleccionados del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145, o bien el de los  
10 cinco miRNAs citados, y se ha decidido que el paciente padece la enfermedad de fibromialgia si el nivel de al menos dos de los miRNAs medidos presentan un valor menor que su correspondiente valor de referencia, el método puede comprender una etapa adicional, en la que se determina si un paciente al que se le ha diagnosticado fibromialgia presenta un nivel  
15 bajo de fatiga mental. Se llegará a esa conclusión cuando, del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145, sólo los niveles de los microRNAs miR-451 y miR-338 presenten un nivel menor que sus correspondientes valores de referencia. Preferiblemente, como en otras realizaciones, se analizarán también los niveles de los controles negativos miR-21, miR-1260b y miR-1908 y se determinará que el paciente diagnosticado de fibromialgia presenta un nivel  
bajo de fatiga mental si, además del criterio referido a los microRNAs miR-451 y miR-338, al menos dos de los controles negativos nos presenten niveles con valores menores que sus correspondientes valores de referencia.

20 Dada la importancia que está adquiriendo la fibromialgia para dificultar el desempeño de la actividad laboral, esta etapa adicional al método diagnóstico podría tener utilidad para diferenciar los pacientes que pueden llevar a cabo ciertas actividades intelectuales y los que tienen serias dificultades para ello, determinando si es necesario o no que a un paciente se le conceda la baja laboral dependiendo de las funciones que realice en su trabajo.

La invención se explicará ahora con mayor detalle por medio de los Ejemplos y Figuras que se incluyen a continuación.

## 25 **Ejemplos**

Los ensayos que se describen en los presentes Ejemplos se llevaron a cabo con los individuos y las muestras de los mismos que se describen a continuación, junto con las herramientas estadísticas utilizadas para su análisis.

### A. Participantes en el estudio

30 Entre enero y abril de 2011 se reclutaron, de forma consecutiva y transversal, 75 pacientes y 79 controles sanos, emparejados por rango de edad, (+/- 5 años), todos ellos procedentes de una única institución: la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de Valencia.

35 Por la naturaleza de la enfermedad de fibromialgia (FM), la selección de pacientes que participaron en el desarrollo del método diagnóstico fue especialmente tomada en cuenta para limitar los posibles sesgos durante la interpretación de los resultados. Los 75 pacientes participantes en el estudio se reclutaron a través de un evento de difusión del estudio en AVAFI (Asociación Valenciana de Afectados de Fibromialgia), en el que se informó detalladamente de los objetivos del estudio y de los análisis necesarios para la ejecución del mismo. Todos los  
40 pacientes cumplieron los criterios del American College of Rheumatology (1990). Los enfermos de FM previamente diagnosticados por sus facultativos especialistas de departamento (FED) interesados en participar lo hicieron acudiendo a las Clínicas Universitarias de la Universidad Católica de Valencia "San Vicente Mártir" en las fechas anunciadas.

45 A los pacientes se les facilitó una hoja informativa del estudio y a todos aquellos que, tras ser informados, aceptaron participar en el mismo se les pidió firmar el correspondiente consentimiento informado, existiendo en todo momento a su disposición la revocación de dicho consentimiento si lo deseara.

La confidencialidad de los participantes se ha mantenido en todo momento de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal. Para ello se les asignó a cada uno de los participantes un código numérico que correlativamente se mantuvo en todas las fracciones que derivaron de su muestra.

5 Los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes fueron los siguientes:

A.1. Criterios de inclusión:

10 Sujeto mayor de 18 años, con diagnóstico previo de fibromialgia (FM) según los criterios descritos por el Colegio Americano de Reumatología (Wolfe et al., "The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee", Arthritis Rheum. 1990, 33(2):160-172), con una historia de dolor generalizado y dolor en determinados puntos anatómicos a la palpación digital.

15 El dolor es considerado generalizado cuando hay dolor en el lado derecho e izquierdo del cuerpo y dolor por encima y por debajo de la cintura. Además debe haber dolor en esqueleto axial (columna cervical, o región anterior del tórax, o columna dorsal, o parte inferior de la espalda). En esta definición el dolor de hombro y nalga se considera dentro de dolor del lado derecho o izquierdo del cuerpo. Dolor en parte baja de la espalda se considera como dolor del segmento inferior.

Existe dolor a la palpación digital, debe estar presente en al menos 11 de los 18 puntos sensibles siguientes:

- 20
- Occipital: Bilateral. En las inserciones del músculo suboccipital.
  - Cervical inferior: Bilateral. En las porciones anteriores de los espacios interapofisarios transversos de C5- C7.
  - Trapecio: Bilateral. En la mitad del borde superior.
- 25
- Supraespinoso: Bilateral. En su origen, encima de la espina de la escápula cercano al borde medial.
  - 2ª costilla: Bilateral. En la 2 unión costo-condral justamente lateral en relación a las uniones de las superficies localizadas por encima.
  - Epicóndilo lateral: Bilateral, 2 cm distal a los epicóndilos.
- 30
- Glúteo: Bilateral. En el cuadrante supero-externo de nalga, en el pliegue anterior del músculo.
  - Trocánter mayor: Bilateral, posterior a la prominencia trocantérea.
  - Rodilla: Bilateral. En la bolsa adiposa medial próxima a la línea articular.

35 La palpación digital debería llevarse a cabo con una fuerza aproximada de 4 Kg. Para que el punto sensible pueda ser considerado positivo, el paciente tiene que indicar si aquella palpación que es dolorosa. Sensible no debe ser considerada dolorosa.

El paciente con la enfermedad de fibromialgia debe cumplir ambos criterios de dolor generalizado y puntual a la palpación. El dolor generalizado debe estar presente por lo menos 3 meses. La presencia de una segunda enfermedad clínica no excluye el diagnóstico de fibromialgia.

40 Se requirió que el diagnóstico de los pacientes de FM participantes en el estudio hubiera incluido una analítica completa de descarte de origen alternativo de sus dolencias: hemograma completo con recuento diferencial de leucocitos, proteína C reactiva, factor reumatoide, alanina

aminotransferasa, albúmina, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, bilirrubina total, calcio, dióxido de carbono, cloro, creatinina, glucosa, potasio, proteínas totales, sodio, nitrógeno ureico, TSH, T3 libre, T4 libre, tiroglobulina, CMV ac. IgG, HBcAc, HBsAc, Hepatitis C.

- 5 Todas las variables estudiadas se almacenaron en una base de datos Access 2003 (Microsoft®, Redmond, WA, EE.UU.).

A.2. Criterios de exclusión:

Sujeto menor de 18 años con existencia de Síndrome de dolor asociado, existencia de otras enfermedades reumatológicas o de otra enfermedad grave y no asociada a FM.

- 10 Los participantes sanos fueron sujetos donantes del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana mayores de 18 años, apareados por edad con un margen de 5 años a los enfermos, sometidos a selección por los procedimientos habituales de despistaje de los Centros de Transfusión en sus campañas de hemodonación, empleando como muestra biológica los "buffy-coats" procedentes de las bolsas de donación. El número de participantes sanos fue de  
15 79.

B. Confirmación de diagnóstico y pruebas adicionales a las que fueron sometidos los pacientes participantes

- 20 El diagnóstico de Fibromialgia de los participantes de este estudio fue confirmado mediante la entrevista, toma de datos que se incluyeron en una base Access con historia clínica y exploración médica física consistente en la palpación digital y confirmación del dolor en al menos 11 de los 18 puntos sensibles, de acuerdo a las exigencias del Colegio Americano de Reumatología (Wolfe et al., 1990, ver cita anterior) ya detalladas en párrafos anteriores.

- 25 Así, a todos los pacientes se les realizó una visita clínica para evaluar los criterios clínicos y la severidad de su fibromialgia. Adicionalmente la confirmación de diagnóstico de Fibromialgia tras la valoración clínica de su médico de los centros de salud de procedencia incluyó los "scores" obtenidos de la evaluación de los participantes mediante cuestionarios psicométricos validados ("case report forms").

Concretamente los cuestionarios psicométricos que se utilizaron fueron:

- 30 a) Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) o Cuestionario Impacto Fibromialgia (Rivera J, González T, "The Fibromyalgia Impact Questionnaire: a validated Spanish version to assess the health status in women with fibromyalgia", Clin Exp Rheumatol., 2004 Sep-Oct, 2285):554-60; Burckhardt CS et al., "The fibromyalgia impact questionnaire: development and validation", J Rheumatol. 1991, 18(5):728-33).
- 35 b) Cuestionario Multidimensional de Fatiga (MFI) para la evaluación de fatiga y el grado de astenia, según la Escala de Intensidad de Fatiga (EIF) diseñada por Krupp y colaboradores (Krupp et al., "The fatigue severity scale. Application to patients with múltiple sclerosis and systemic lupus erythematosus", Arch Neurol. 1989; 46(10):1121-3).
- 40 c) Cuestionario de salud y bienestar (SF36) (Ware JE, Jr., Sherbourne CD, "The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection", Med Care 1992; 30:473-483; Bullinger M et al, "[SF-36 Health Survey in Rehabilitation Research. Findings from the North German Network for Rehabilitation Research, NVRF, within the rehabilitation research funding program]", Rehabilitation (Stuttg). 2003, 42(4):218-25).

- 45 Aquellos pacientes con una puntuación mayor o igual que la mediana de la población general respecto de la astenia o una reducción de la actividad de acuerdo con las escalas del MFI

cumplieron criterios según la definición de casos del consenso de 1994 (<http://www.cdc.gov/cfs/case-definition/1994.html>, revisado 9/JUN/14).

El grupo control estaba constituido por pacientes sanos donantes de sangre del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana.

- 5 Se obtuvo una muestra de sangre completa por individuo tras la firma del consentimiento informado.

Las variables demográficas, clínicas y biológicas se recogieron en una base de datos Access 2003 (Microsoft®, Redmond, WA, EE.UU.) con anonimización de las muestras según criterios establecidos por la LOPD (Ley Orgánica 15/1999).

- 10 Este estudio fue aprobado por el Comité de Ensayos Clínicos e Investigación (CEIC) del Hospital de la Plana en Vila-Real (Castellón, España).

Como criterio de selección de los 11 pacientes sometidos a análisis molecular se utilizó el presentar al menos 16 puntos de dolor.

### C. Toma de muestras, procesamiento y almacenaje

- 15 C.1. Toma de muestra

La toma de sangre única de los enfermos de FM participantes consistente en un volumen final de aproximadamente 20 cc/paciente, se realizó mediante punción intravenosa en 2 tubos Vacutainer conteniendo, cada uno de ellos, 170 IU de heparina de litio como anticoagulante (Becton Dickinson BD 365725).

- 20 Todas las muestras fueron procesadas en tiempos inferiores a 2 h tras su extracción, manteniendo las muestras a temperatura ambiente (TA) durante ese periodo.

En el caso de muestras control el volumen de *buffy-coats* (fracción de una muestra de sangre a la que se le ha añadido anticoagulante, obtenida tras someter la sangre a una centrifugación en gradiente de densidad, y que contiene la mayor parte de los glóbulos blancos y las plaquetas) fue superior a 20cc/donante. Igualmente las muestras fueron procesadas dentro de las 2 h siguientes a su recolección en el Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, manteniendo las muestras a TA (temperatura ambiente) hasta el momento de su procesamiento.

### C.2. Preparación de miRNAs de sangre periférica

- 30 C.2.1 Aislamiento de PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* o células mononucleares de sangre periférica).

Para el aislamiento de las PBMCs se utilizaron tubos Modelo de tubo BD VacutainerCPT Mononuclear Cell Preparation 362753 Tube with Sodium 120 USP Heparine siguiendo las instrucciones del fabricante (Becton Dickinson).

- 35 Los tubos se invirtieron 8-10 veces para mezclar la sangre previa centrifugación. La centrifugación se realizó en una centrífuga Eppendorf modelo 5810R con rotor basculante programada a 1800 g durante 15-20 min a TA, en ausencia de aceleración y frenado.

Tras la separación de fracciones, el plasma se alicuoteó en criotubos y tras su etiquetado se conservaron a -80°C. El anillo o capa de mononucleares ("*buffy coat*") se aspiró con cuidado con una pipeta de calibre amplio y se colocó en un tubo limpio de 15 ml para proceder a la lisis de posibles eritrocitos contaminantes. Para ello se incubaron sobre hielo con 1 volumen de tampón de lisis de eritrocitos (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4, 0,1 mM EDTA) durante 5 minutos, y se centrifugaron de nuevo a 500g durante 10 minutos a TA, esta vez ya con frenado del rotor, para eliminar en el sobrenadante los desechos de rotura.

Finalmente las PBMCs se sometieron a dos lavados en solución tampón PBS (solución salina pH 7,4; 1 volumen) mediante resuspensión seguida de centrifugación a 300g 15 minutos a TA.

5 Los pellets se resuspendieron en medio de congelación consistente en una mezcla de suero fetal bovino (FBS) al 90% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% como agente crioprotector. Para el conteo de células viables, se tomó una muestra de 10 µl en Trypan Blue al 50% y se procedió al conteo en una cámara de Neubauer. Se ajustó la concentración de PBMCs a  $10^7$  células/ml y, tras su alicuotado en crioviales de 0,5 ml, se almacenaron a  $-150^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Estos procedimientos fueron realizados en condiciones de esterilidad utilizando una campana de cultivos AV-100 Telstar Ref: 23812 con lámpara ultravioleta.

#### 10 C.2.2 Obtención de miRNAs

La extracción de RNA total incluyendo los miRNAs y otros RNAs de pequeño tamaño, se realizó utilizando el kit de aislamiento mirVana™ (Ambion, cat #AM1560) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

15 Las concentraciones e integridad del RNA total aislado se obtuvo mediante análisis espectrofotométrico (Nanodrop 200, ThermoScientific) (ver Tabla 2 más adelante, en la que se indican los valores de las concentraciones calculadas por este sistema) y mediante análisis por electroferograma (Eukaryote Total RNA Nano chips y los sistemas 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies; y Agilent 2100 Expert Software, Agilent Technologies) según las instrucciones del producto. Se seleccionaron las muestras cuyos perfiles mostraban integridad del RNA  
20 extraído, bien porque se trataba de muestras cuyo RIN (*RNA Integrity Number*: valor de integridad del RNA, calculado con el citado software de Agilent según se discute en la página web: [http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pagelId=2181&\\_requestid=266525](http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pagelId=2181&_requestid=266525)), superaba el valor de 7,0 ó, en aquellos casos en los que el sistema no ofreció cálculo del número de RIN (circunstancia que a veces ocurre con muestras que no están degradadas), se valoró el  
25 espectro de la muestra, eligiendo aquellas en las que el espectro era compatible con muestras no degradadas. Dicho análisis se realizó en la Unidad de Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, siendo confirmado por Toray Industries (Japón) sobre las muestras que les fueron remitidas.

30 Una vez recibidos los resultados del análisis por microarrays, se analizaron de nuevo por electroferograma, mediante los sistemas de Agilent antes citados (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies; y Agilent 2100 Expert Software, Agilent Technologies), las alicuotas de las muestras de RNA total conservadas en Valencia, para asegurar su calidad antes de proceder al análisis por qPCR. .

35 La abundancia relativa de miRNAs (% miRNA) en las preparaciones de RNA total fueron determinadas mediante los "*small RNA kits*" del sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) y el correspondiente Agilent 2100 Expert Software (Agilent Technologies), según las instrucciones del producto, en la Unidad de Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Los valores obtenidos se incluyen también en la Tabla 2 que se muestra a continuación.

40

Tabla 2. Concentración, integridad y pureza de las preparaciones de RNA total analizadas.

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ l)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	RIN	miRNA (%)
Controles:					
C1	168	1,98	2,31	N/A*	10
C2	182,5	2,03	1,62	8,1	12
C3	187,4	2,06	2,17	8,4	15
C4	341,9	2,06	2,05	8,3	15
C5	195,4	2,02	2,15	7,4	15
C6	184,8	2	2,2	8,3	13
C7	187,1	2,07	2,14	8,5	15
C8	200,1	1,94	2,15	N/A	21
C9	189	2,02	2,24	7,2	16
C10	191,6	2,02	2,2	7,7	8
Pacientes:					
FM1	176,6	1,94	2,15	N/A*	14
FM2	183,6	1,94	2,14	10	16
FM3	185,3	1,94	1,86	10	11
FM4	166,9	1,93	2,15	10	39
FM5	188	1,96	1,49	N/A*	18
FM6	165,5	1,94	2,19	10	4
FM7	118,8	1,92	2,27	N/A*	16
FM8	164,7	1,96	2,15	10	19
FM9	179,2	1,93	2,1	N/A*	30
FM10	177	1,91	2,22	N/A*	6
FM11	174	1,93	2,13	N/A*	4

\* N/A: No analizado por el aparato: analizado por personal técnico a partir del espectro

#### D. Análisis estadístico

5 Los resultados se expresaron en porcentajes comparando la población enferma frente a la población control. Para determinar la correlación entre variables cualitativas se empleó el test de Chi-cuadrado. Para determinar la correlación entre variables cuantitativas se empleó el test de la U de Mann-Whitney. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas si  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EE.UU.).

## - Ejemplo 1: Análisis de la expresión de miRNAs mediante tecnología de microarrays

### 1.1. Resultados obtenidos de los microarrays y análisis de los mismos

Los RNAs totales extraídos a partir de PBMCs de 11 enfermos de FM y 10 sujetos control se enviaron a Japón (Toray Industries) en hielo seco vía transporte Courier, donde fueron  
5 analizados. Las fracciones fueron reanalizadas por electroferograma, confirmando que todas las muestras analizadas presentaban perfiles compatibles con integridad del RNA extraído, presentando la mayor parte de ellas un RIN superior a 7,0.

El marcaje del RNA total se realizó mediante marcaje fluorescente Hy5<sup>TM</sup> con el kit miRCURY LNA Array miR (Exiqon, Vedbaek, Denmark). Los RNAs marcados se hibridaron a microarrays  
10 3D-Gene Human miRNA Oligo chips (v.16.0; Toray Industries, Tokyo, Japón). La anotación y secuencias de las sondas de oligonucleótidos de estos sistemas de array son conformes a base de miRBase Release 16 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Tras lavado riguroso, las señales fluorescentes fueron escaneadas con un 3D-Gene Scanner (Toray Industries) y analizadas con la ayuda del 3D-Gene Extraction software (Toray Industries).

Cada chip mostró un patrón similar en cuanto a la distribución de señal (Fig. 1) por lo que se pudo adaptar normalización global de los datos. Los datos registrados en cada punto fueron normalizados utilizando la intensidad media de ruido de fondo determinada a partir de todos los blancos del array con intervalos de confianza del 95%. Las medidas de los duplicados cuyas señales superaron valores mayores de 2 desviaciones estándar (2SD) en referencia a la señal  
20 de ruido de fondo fueron consideradas válidas. Los niveles de expresión relativa de un miRNA determinado fueron calculados por comparación de medias de los duplicados válidos obtenidos en referencia a su valor medio experimental del microarray. Los datos fueron normalizados globalmente por array, ajustando la mediana de la señal de intensidad a 25.

El análisis de los datos obtenidos sobre los niveles de miRNAs de los 11 pacientes de FM y 10 donantes sanos pareados por edad ( $\pm 5$  años) mediante tecnología de microarrays 3D-Gene Human miRNA Oligo chips (v.16.0; Toray Industries, Tokyo, Japan), mostró una marcada predominancia de niveles de miRNAs inferiores a los encontrados en los sujetos control. En concreto el 16% de los miRNAs analizados (193/1212) presentaron al menos una reducción del 50% y el 3% de los miRNAs (40/1212) una reducción del 75% o mayor.

Para la elaboración del heatmap de los microarrays se seleccionaron los miRNAs que presentaron diferencias entre los grupos control (C) y enfermo (FM) mayores de 4 veces. Se denomina "*heatmap*" a una representación gráfica de los datos donde los valores individuales contenidos en una matriz se representan como colores. En este caso, el programa utilizado para la realización del heatmap fue R 3.0.2 [R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>].

El *heatmap* obtenido se representa en la Fig. 2, en la que los tonos originales (que varían del rojo al anarajado y amarillo en el original) aparecen representados en escala de grises, de manera que los tonos más oscuros corresponden a valores de menor intensidad de la señal detectada tras la normalización global de valores del microarray.

De entre los miRNAs inhibidos se seleccionaron los que presentaban una inhibición más marcada, en concreto los que presentaban inhibición, entre 6-13 veces menores que los niveles de sujetos sanos, para su validación por PCR a tiempo real. Dichos microRNA eran los microRNAs humanos miR-451, miR-338-3p, miR-143, miR-145 y miR-223 (hsa-miR-451a, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-223-3p, denominados en la base de datos de Toray Industries correspondiente al microarray como hsa-miR-451, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-143, hsa-miR-145, hsa-miR-223. Cuatro de ellos se seleccionar por poseer medias más distintas entre pacientes de fibromialgia y controles; en el caso del miR-223, la distancia

era menor, pero la lectura de señal era más alta. En la Tabla 3, a continuación, se muestran los datos de las lecturas de intensidad individuales, para cada uno de los participantes, obtenidas de los microarrays 3D-Gene Human miRNA Oligo chips (v.16.0; Toray Industries, Tokyo, Japón), tras su normalización global, para los 5 miRNAs inhibidos a niveles 6 o más según los valores de media aritmética, utilizando la nomenclatura del microarray.

Tabla 3. Datos de los microarrays de los 5 miRNAs biomarcadores tras normalización global

Muestra	hsa-miR-451	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-143	hsa-miR-145	hsa-miR-223
C1	2227,48666 5	264,158394	375,810287	473,615044	51653,58662
C2	19593,3201 1	267,717549	582,351337	567,217323	61996,61509
C3	3301,83803	550,424219	781,253618	852,589258	77138,77704
C4	3730,19307 4	428,644897	815,749709	824,653082	72748,40494
C5	1146,57384 7	343,727175	492,042899	589,576509	77202,87996
C6	<u>683,433897</u> a	199,506422	319,849416	380,558555	39896,82884
C7	1889,09247 5	743,848307	604,228968	638,500033	88579,28544
C8	7335,50977 9	357,198588	502,167721	484,688854	86658,50076
C9	5135,83229 5	459,920309	474,336505	533,642298	76955,8396
C10	3257,45824 9	<u>126,838433</u> a	<u>114,763235</u> a	<u>115,432316</u> a	<u>34539,07342</u> a
FM1	305,834489	26,318745	15,177271	18,555039	10111,73509
FM2	206,559244	32,832642	16,001444	16,108543	11116,44533
FM3	1734,44569 9	32,143672	b	b	7050,559134
FM4	161,655279	b	20,372658	28,646992	6314,357339
FM5	330,340215	53,035094	82,148401	75,426581	16817,24877
FM6	202,124686	16,338276	24,650354	25,399775	9053,612596
FM7	78,315045	17,962685	22,405244	20,470409	5860,535658
FM8	119,190489	19,81887	16,264705	38,761781	11742,76138
FM9	337,022127	47,754941	194,84006	233,920951	19213,67863
FM10	259,317146	b	b	b	4221,946537

Muestra	hsa-miR-451	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-143	hsa-miR-145	hsa-miR-223
<b>FM11</b>	210,059273	43,730618	16,916919	15,923472	14852,24993

<sup>a</sup> Los valores subrayados corresponden al límite inferior del rango de valores control.

<sup>b</sup> Las casillas en blanco corresponden a determinaciones de lectura faltantes

5 Como control se seleccionaron miRNAs con diferencias en niveles de expresión menores a 4 veces: hsa-miR-1260b, hsa-miR-1908-5p y hsa-miR-21-5p, denominados en el microarray hsa-miR-1260, hsa-miR-1908 y hsa-miR21. En la Tabla 4, a continuación, se muestran los datos de las lecturas de intensidad individuales, para cada uno de los participantes, obtenidas de los microarrays 3D-Gene Human miRNA Oligo chips (v.16.0; Toray Industries, Tokyo, Japón), tras su normalización global, para los 3 miRNAs inhibidos a niveles inferiores a 4 veces según los valores de media aritmética, utilizando para los miRNAs la nomenclatura del microarray .

10 Tabla 4.- Datos de los microarrays de los 3 miRNAs seleccionados como posibles marcadores negativos, tras normalización global

Muestra	hsa-miR-21	hsa-miR-1260b	hsa-miR-1908
<b>C1</b>	3360,142615	28151,8309	672,614777
<b>C2</b>	7785,488521	29881,7485	573,149245
<b>C3</b>	6610,461283	18698,6661	781,557803
<b>C4</b>	5658,2508	28255,2295	581,519534
<b>C5</b>	5343,510235	26120,276	896,785265
<b>C6</b>	6043,767411	20401,0122	<u>568,902254</u> <sup>a</sup>
<b>C7</b>	6999,363226	25526,4404	852,633589
<b>C8</b>	<u>3001,680858</u> <sup>a</sup>	19382,0309	1122,87105
<b>C9</b>	5187,202282	23852,3069	953,236029
<b>C10</b>	4710,493502	<u>16492,401</u> <sup>a</sup>	622,69169
<b>FM1</b>	1241,750335	16416,3459	554,24173
<b>FM2</b>	1304,220922	19216,0524	514,93731
<b>FM3</b>	1626,655657	24312,6231	840,11438
<b>FM4</b>	757,147795	15735,7582	445,864872
<b>FM5</b>	2096,750386	26072,6375	659,583933
<b>FM6</b>	1840,144328	19454,8228	406,420377
<b>FM7</b>	783,224453	15751,1767	401,503764

<b>FM8</b>	1360,727881	17345,3276	292,404162
<b>FM9</b>	2102,365502	7877,05237	1420,53831
<b>FM10</b>	753,048593	11333,0003	982,798912
<b>FM11</b>	1638,51156	17409,8649	746,514169

<sup>a</sup> Los valores subrayados corresponden al límite inferior del rango de valores control

5 La Tabla 5 a continuación resume los niveles medios de dichos ocho microRNAs (los cinco con niveles de inhibición superiores a 4 y los tres que presentaban niveles de inhibición inferiores a dicho valor) en los controles sanos y en los pacientes con fibromialgia, así como la relación entre ambos valores medios. De nuevo se utiliza para los microRNAs la nomenclatura del microarray.

Tabla 5.- Valores medios de los niveles de los miRNAs seleccionados en los ensayos de microarrays para el método diagnóstico de pacientes de fibromialgia (FM)

miRNA	Media	Media	
	Controles	FM	Media C/MediaFM
hsa-miR-143	506,26	45,42	11,15
hsa-miR-145	546,05	52,58	10,39
hsa-miR-223	66736,98	10577,74	6,31
hsa-miR-338-3p	374,2	32,22	11,62
hsa-miR-451a	4830,07	358,62	13,47
hsa-miR-1260b	23676,19	17356,79	1,36
hsa-miR-1908	762,6	660,45	1,15
hsa-miR-21	5470,04	1409,5	3,88

10 Con los datos de las Tablas 3 y 4 anteriores se obtuvieron, a nivel individual, los niveles de inhibición de los 5 miRNAs marcadores de Fibromialgia seleccionados y de los 3 posibles controles negativos. Dichos niveles de inhibición se calcularon como la relación de valores de los valores obtenidos en microarrays 3D-Gene Human miRNA Oligo chips (v.16.0; Toray Industries, Tokyo, Japón) tras normalización global de cada paciente en referencia al valor inferior de lectura del rango de valores de los controles. Dichos valores inferiores son los que  
15 aparecen subrayados en las Tablas 3 y 4 anteriores.

Los valores obtenidos para los niveles de inhibición así calculados se muestran a continuación en la Tabla 6 (miRNAs marcadores de fibromialgia) y la Tabla 7 (miRNAs posibles controles negativos) .

20

Tabla 6.- Niveles individuales de inhibición de los 5 miRNAs seleccionados como posible marcadores de fibromialgia

Paciente	hsa-miR-451	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-143	hsa-miR-145	hsa-miR-223
<b>FM1</b>	2,23	4,82	7,56	6,22	3,42
<b>FM2</b>	3,31	3,86	7,17	7,17	3,11
<b>FM3*</b>	<u>0,39 #</u>	3,95			4,90
<b>FM4</b>	4,23		5,63	4,03	5,47
<b>FM5</b>	2,07	2,39	<u>1,40 #</u>	<u>1,53 #</u>	2,05
<b>FM6</b>	3,38	7,76	4,66	4,54	3,81
<b>FM7</b>	8,73	7,06	5,12	5,64	5,89
<b>FM8</b>	5,73	6,40	7,06	2,98	2,94
<b>FM9</b>	2,03	2,66	<u>0,59 #</u>	<u>0,49 #</u>	<u>1,80 #</u>
<b>FM10*</b>	2,64				8,18
<b>FM11</b>	3,25	2,90	6,78	7,25	2,33

\* Pacientes con sólo dos de los cinco miRNAs inhibidos al menos 2 veces

# Valores subrayados: no inhibición o inhibición que no supera el valor de 2 veces

5 Tabla 7.- Niveles individuales de inhibición de los 3 miRNAs seleccionados como posibles marcadores negativos

Paciente	hsa-miR-21	hsa-miR-1260b	hsa-miR-1908
<i>FM1*</i>	<u>2,42 #</u>	1,00	1,03
<i>FM2*</i>	<u>2,30 #</u>	0,86	1,11
FM3	1,85	0,68	0,68
<i>FM4*</i>	<u>3,96 #</u>	1,05	1,29
FM5	1,43	0,63	0,87
FM6	1,63	0,85	1,41
<i>FM7*</i>	<u>3,83 #</u>	1,05	1,43
<i>FM8*</i>	<u>2,21 #</u>	0,95	1,96
<i>FM9*</i>	1,43	<u>2,09 #</u>	0,40
<i>FM10*</i>	<u>3,99 #</u>	1,46	0,58
FM11	1,83	0,95	0,77

\* Pacientes con sólo dos de los tres miRNAs no inhibidos o con inhibición que no alcanza el valor de 2 veces

# Valores subrayados: inhibición que supera el valor de 2 veces

## 1.2. Abundancia relativa de miRNAs

Para descartar un posible sesgo derivado de diferencias en el rendimiento de extracción de miRNAs respecto a RNA de mayor tamaño, que pudiera conducir a una errónea conclusión de inhibición o sobreexpresión generalizada, se evaluó la abundancia relativa de miRNAs en cada una de las preparaciones de RNA total analizadas.

Como resume la Tabla 2 (columna "miRNAs %"), la media de la abundancia relativa en preparaciones de PBMCs control (14%) es similar a la de las preparaciones de RNA total de PBMCs de enfermos de FM (16%). Aunque el rango de abundancias relativas de miRNAs en preparaciones de enfermos (4-39%) es mayor que el de abundancias relativas de miRNAs en controles (8-21%), no podría justificar las diferencias detectadas en abundancias relativas medias de hasta 13 veces para algunos miRNAs (ver Tabla 5, hsa-miR-451).

Tras esta comprobación, se seleccionaron para su validación por PCR a tiempo real los cinco miRNAs que presentaban la inhibición más marcada (entre 6-13 veces menores que los niveles de los sujetos sanos). Como control se seleccionaron los miRNAs con diferencias en niveles de expresión menores a 4 veces antes citados, hsa-miR-21, hsa-miR-1908, hsa-miR-1260b.

### - Ejemplo 2: Análisis de la expresión de miRNAs mediante tecnología de microarrays

#### 2.1. Amplificación de secuencias miRNAs mediante amplificación por qRT-PCR (Quantitative-Reverse Transcribed-PCR)

La retrotranscripción del RNA total extraído se realizó utilizando el kit miScript II RT (Qiagen, cat # 218161) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cDNAs (complementary DNAs) obtenidos de dicho proceso de transcripción inversa fueron amplificados mediante PCR a tiempo real o PCR cuantitativa utilizando el kit miScript SYBR Green PCR (Qiagen, cat #218073). Las secuencias de los cebadores directos ("*primers forward*") utilizados para el ensayo se muestran en la Tabla 8, junto con el número de secuencia que le corresponde en el listado adjunto; el cebador inverso ("*primer reverse*") fue común a todas las amplificaciones correspondiendo al Universal Primer (UP) provisto por el fabricante del kit, y de secuencia desconocida.

Tabla 8: Listado de cebadores directos utilizados para amplificar los miRNAs elegidos

Nombre del miRNA diana	Secuencia del miRNA maduro	Secuencia del cebador directo (5' – 3')	T <sub>m</sub> * (°C)	SEQ ID NO:
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	TGTCAGTTTGTCAAATACCC	50,3	9
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU	AAACCGTTACCATTACTGAG	49,8	10
hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG	TCCAGCATCAGTGATTTTGT	52,1	11
hsa-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	TGAGATGAAGCACTGTAGC	51,9	12
hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	GTCCAGTTTTCCCAGGAATCC	55,7	13
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	TAGCTTATCAGACTGATGTT	47,9	14

hsa-miR-1908-5p	CGGCGGGGACGGCGAUUGGUC	CGGCGGGGACGGCGATTGG	66,9	15
hsa-miR-1260b	AUCCACCACUGCCACCAU	ATCCACCACCTGCCACC	57,9	16

\* Tm: temperatura de fusión ("*melting temperature*":

temperatura a la cual el dúplex cebador/molde está en forma monocatenaria)

5 Los cebadores directos utilizados se diseñaron específicamente para el presente ensayo y, en algunos casos, son más cortos que su correspondiente miRNA. El diseño se realizó buscando eliminar posibles estructuras secundarias ("*hairpin loops*": bucles de horquilla) que limiten su uso como cebador y ajustando su Tm de manera que permitiera el análisis conjunto de los ocho miRNAs y/o para que distara suficientemente de la Tm de las posibles horquillas para evitar su formación durante la fase de apareamiento ("*annealing*") y amplificación. De esta forma, se garantiza que los miRNAs detectados fueron sólo miRNAs maduros. Si se detectaran también los precursores, se observarían dos Tm del producto de PCR amplificado, lo cual no se observó en ningún caso.

15 La amplificación a tiempo real se realizó en un termociclador LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Suiza) bajo condiciones de amplificación estándar que incluyeron una etapa de activación de la polimerasa hotstart de 15 minutos a 94°C seguida de 45 ciclos consistentes en 3 etapas: desnaturalización durante 15 segundos a 95°C, hibridación durante 30 segundos a 55°C y extensión durante 30 segundos a 70°C. La cuantificación relativa de los productos amplificados se realizó utilizando los niveles de amplificación de un RNA nuclear, concretamente el snRNA U6, de cada muestra. El cebador específico para la amplificación del U6 utilizado es un componente del kit.

25 Los resultados obtenidos se indican a continuación en la Tabla 9, y se han representado en la Fig. 3. En la misma puede verse que los miRNAs inicialmente seleccionados como posibles biomarcadores de fibromialgia muestran variaciones significativas ( $p < 0,05$ ), mientras que los tres marcadores elegidos como controles (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-1908-5p, y hsa-miR-1260b) no mostraron variaciones significativas ( $p > 0,05$ ).

Tabla 9. Determinación de la expresión relativa de miRNAs en pacientes (FM) vs Controles (C) mediante Q-PCR. Los resultados se expresan como medianas (-delta Ct),  $\Delta\Delta Ct$ , factor de cambio ("*fold change*":  $2^{\Delta\Delta Ct}$ ). Los cambios se consideran significativos si  $p < 0,05$ .

miRNA	FM	C	$\Delta\Delta Ct$	Factor de cambio	Valor P
	Mediana (-delta Ct)	Mediana (-delta Ct)		$(2^{\Delta\Delta Ct})$	
hsa-miR-223-3p	22,1	17,8	4,3	19,7	0,00
hsa-miR-451a	30,0	23,8	6,2	73,5	0,02
hsa-miR-338-3p	30,7	24,1	6,6	97,0	0,00
hsa-miR-145-5p	31,0	25,4	5,6	48,5	0,01
hsa-miR-143-3p	31,5	25,4	6,1	68,5	0,00
hsa-miR-21-5p	23,1	20,1	3,0	8,0	0,31

hsa-miR-1908-5p	36,4	32,9	3,5	11,3	0,07
hsa-miR1260b	25,8	22,9	2,9	7,46	0,54

Los resultados de la Tabla anterior confirman, mediante una técnica alternativa (PCR cuantitativa) que los niveles de los miRNAs hsa-miR-143-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-338-3p y hsa-miR-451a se hallan significativamente reducidos ( $p < 0,05$ ) en pacientes de FM; mientras que los niveles de los hsa-miR-21-5p, hsa-miR-1260b y hsa-miR-1908-5p no muestran diferencias significativas entre grupos.

Por tanto, los microRNAs seleccionados son adecuados para basar en ellos un método diagnóstico de pacientes de fibromialgia.

**- Ejemplo 3: Asociación entre niveles de miRNAs y síntomas de fibromialgia**

Para determinar si las diferencias observadas entre los niveles de expresión de los miRNAs hsa-miR-143-3p (mir-143), hsa-miR-145-5p (miR-145), hsa-miR-223-3p (miR-223), hsa-miR-338-3p (miR-338) y hsa-miR-451a (miR-451) se hallan asociadas a la severidad sintomática de los pacientes, se evaluó su correlación con la puntuación FIQ (como indicador del impacto de la enfermedad) y los niveles de fatiga mental (*Mental Fatigue*: MF). En ambos casos, el valor es mayor, cuanto mayor es el impacto de la sintomatología en la vida del paciente. De acuerdo con los resultados obtenidos, se considerará que un paciente presenta nivel bajo de fatiga mental cuando presenta un nivel de 10 o inferior a 10, evaluado según el Cuestionario Multidimensional de la Fatiga (MFI) previamente mencionado.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico de correlación de cada uno de los miRNAs inhibidos y las puntuaciones de los cuestionarios FIQ y MFI se muestran en la Tabla 10 a continuación. En la Fig. 4 puede observarse una representación de la correlación entre cada uno de los miRNAs y la fatiga mental (MF).

Tabla 10.- Relación de miRNAs asociados con FM con síntomas cardinales de la enfermedad

<b>Spearman</b>	<b>Columna1</b>	<b>miR-143</b>	<b>miR-145</b>	<b>miR-223</b>	<b>miR-338</b>	<b>miR-451</b>
<b>FIQ</b>	n	9	9	11	9	11
	rs	-0,19	0,14	0,03	0,10	-0,33
	t-stat	0,41	0,35	0,33	0,36	0,38
	Valor p	0,693	0,737	0,750	0,730	0,710

<b>Spearman</b>		<b>miR-143</b>	<b>miR-145</b>	<b>miR-223</b>	<b>miR-338</b>	<b>miR-451</b>
<b>MF</b>	n	9	9	11	9	11
	rs	-0,38	-0,37	0,01	-0,76	-0,58
	t-stat	0,44	0,44	0,33	0,50	0,42
	Valor p	0,671	0,671	0,748	0,631	0,685

n: número de individuos

rs: rho de Spearman de la abundancia relativa de miRNAs frente a severidad sintomática

t-stat:: "*two-tailed significance*" (significación de dos colas)

- 5 Aunque en ninguno de los casos pudo apreciarse una correlación estadísticamente significativa, en la observación de la Fig. 4 y en el análisis de los datos de las Tablas 6 y 7, especialmente la primera, llama la atención el hecho de que el paciente 9, con un índice menor de fatiga mental, presente unos niveles más cercanos a los de los miRNAs control, sobre todo en 3 de los miRNAs seleccionados como marcadores (hsa-miR-143-3p, hsa-miR-145-5p y hsa-miR-223-3p), y no presente diferencias marcadas respecto al resto de valores del grupo de pacientes para los miRNAs control (hsa-miR-21-5p y hsa-miR-1260b).
- 10 Por ello, se propone que el método diagnóstico incluya una etapa adicional, en la que se determine que un paciente, aún padeciendo fibromialgia, presenta un nivel bajo de fatiga mental cuando se analizan los cinco miRNAs de grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145 (o, alternativamente, cuatro, prescindiendo de miR-143 ó miR-145) y sólo los niveles de miR-451 y miR-338 son menores que sus correspondientes valores de referencia;
- 15 preferiblemente, el nivel bajo de fatiga mental sólo se diagnosticará cuando, además, se hayan analizado los controles negativos miR-21, miR-1260b y miR-1908 y al menos dos de ellos no presenten niveles con valores menores que sus correspondientes valores de referencia; más preferiblemente, se incluirá además el criterio de que el tercer microRNA del grupo de los controles negativos tampoco presente un nivel con un valor que pueda considerarse menor que
- 20 su correspondiente valor de referencia o que la disminución con respecto al valor de referencia sea inferior a 4 ó, preferiblemente, inferior a 3.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar si un individuo padece la enfermedad de Fibromialgia, que comprende las etapas de:
  - 5 a) medir el nivel de los miRNAs miR-223 y miR-451 en una muestra de sangre periférica tomada del individuo;
  - b) decidir que el paciente padece la enfermedad de fibromialgia si el nivel de al menos uno de los dos miRNAs analizados miR-223 y miR-451 presenta un valor menor que un valor de referencia.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que adicionalmente se mide el nivel de al menos uno de los miRNAs seleccionado del grupo de miR-338, miR-143 y miR-145.
3. El método según la reivindicación 1, en el que adicionalmente se mide el nivel de al menos dos de los tres miRNAs del grupo de miR-338, miR-143 y miR-145.
4. El método según la reivindicación 1, en el que adicionalmente se mide el nivel de los tres  
15 miRNAs del grupo de miR-338, miR-143 y miR-145.
5. El método según la reivindicación 3, en el que los niveles del miRNA no incluido en la medida es el miRNA miR-143 ó el miR-145.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-4 en el que adicionalmente se decide que el individuo padece la enfermedad de fibromialgia si el nivel de al menos uno de dichos  
20 miRNAs del grupo miR-338, miR-143 y miR-145 presenta un valor menor que un valor de referencia.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente medir los niveles de al menos uno de los miRNAs de entre el grupo de miR-21, miR-1908 y miR-1260b.
- 25 8. El método según la reivindicación 7, en el que se decide que el paciente padece la enfermedad de fibromialgia si, además de cumplir los criterios que se refieren a los otros 5 miRNAs, el nivel de al menos uno de los miRNAs del grupo miR-21, miR-1260b y miR-1908 no presenta un valor menor que un valor de referencia.
9. El método según la reivindicación 7, en el que se decide que el paciente padece la  
30 enfermedad de fibromialgia si, además de cumplir los criterios que se refieren a los otros 5 miRNAs, el nivel de al menos dos de los miRNAs del grupo miR-21, miR-1260b y miR-1908 no presenta un valor menor que un valor de referencia.
10. El método según la reivindicación 7, en el que se decide que el paciente padece la  
35 enfermedad de fibromialgia si, además de cumplir los criterios que se refieren a los otros 5 miRNAs, el nivel de los tres miRNAs del grupo miR-21, miR-1260b y miR-1908 no presenta un valor menor que un valor de referencia
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que para cada miRNA, su correspondiente valor de referencia es el valor medio de los niveles de expresión de dicho miRNA en individuos sanos.
- 40 12. El método según la reivindicación 11, en el que un miRNA presenta un nivel cuyo valor es menor que un valor de referencia cuando el valor del nivel es la mitad del valor de referencia o inferior.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la medida de los niveles de miRNAs se hace sobre células mononucleares de sangre periférica obtenidas del paciente.
- 5 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se detectan los niveles de los miRNAs mediante técnicas asociadas a secuencias complementarias o PCR cuantitativa (qPCR).
15. El método según la reivindicación 14, en el que la detección de los niveles de miRNAs se realiza mediante una técnica asociada a secuencias complementarias, que implica la hibridación en un microchip de una muestra ya marcada.
- 10 16. El método según la reivindicación 14, en el que se detectan los niveles de los miRNAs mediante PCR cuantitativa con retrotranscripción previa.
17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que individuo en el que se efectúa el diagnóstico es un ser humano.
- 15 18. El método según la reivindicación 17, en el que los miRNAs del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145 son, concretamente hsa-miR-223-3p (SEQ ID NO:1), hsa-miR-451a (SEQ ID NO:2) , hsa-miR-338-3p (SEQ ID NO:3), hsa-miR-143-3p (SEQ ID NO:4), hsa-miR-145-5p (SEQ ID NO:5), respectivamente, y los miRNAs del grupo de miR-21, miR-1908 y miR-1260b son concretamente hsa-miR-21-5p (SEQ ID NO:6), hsa-miR-1908-5p (SEQ ID NO:7) y hsa-miR-1260b (SEQ ID NO:8), respectivamente.
- 20 19. El método según la reivindicación 17, en el que se detectan los niveles de los miRNAs mediante PCR cuantitativa con retrotranscripción previa, y los cebadores directos de la PCR cuantitativa se seleccionan del grupo de: SEQ ID NO:9 (para hsa-miR-223-3p), SEQ ID NO:10 (para hsa-miR-451a), SEQ ID NO:11 (para hsa-miR-338-3p), SEQ ID NO:12 (para hsa-miR-143-3p), SEQ ID NO:13 (para hsa-miR-145-5p), SEQ ID NO:14 (para hsa-miR-21-5p), SEQ ID NO:15 (hsa-miR-1908-5p), SEQ ID NO:16 (para hsa-miR-1260b).
- 25 20. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 19, que comprende una etapa adicional, en la que se determina que un paciente al que se le ha diagnosticado fibromialgia presenta un nivel bajo de fatiga mental cuando, del grupo de miR-223, miR-451, miR-338, miR-143 y miR-145, sólo los niveles de los microRNAs miR-451 y miR-338 presentan un nivel menor que sus correspondientes valores de referencia.
- 30 21. El método según la reivindicación 20, en el que se determina que un paciente al que se le ha diagnosticado fibromialgia presenta un nivel bajo de fatiga mental cuando, adicionalmente, se hayan analizado los controles negativos miR-21, miR-1260b y miR-1908 y al menos dos de ellos no presenten niveles con valores menores que sus correspondientes valores de referencia.
- 35

Fig. 1

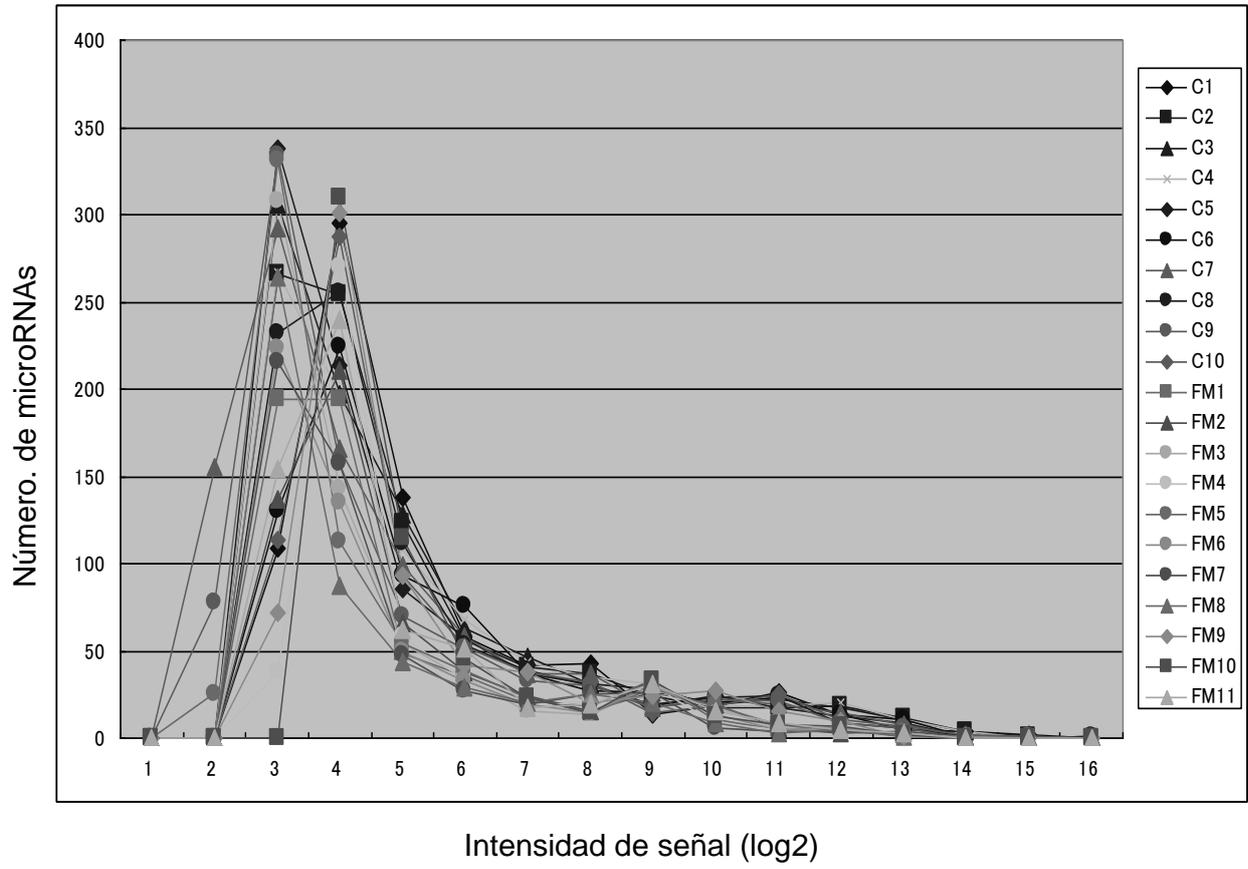
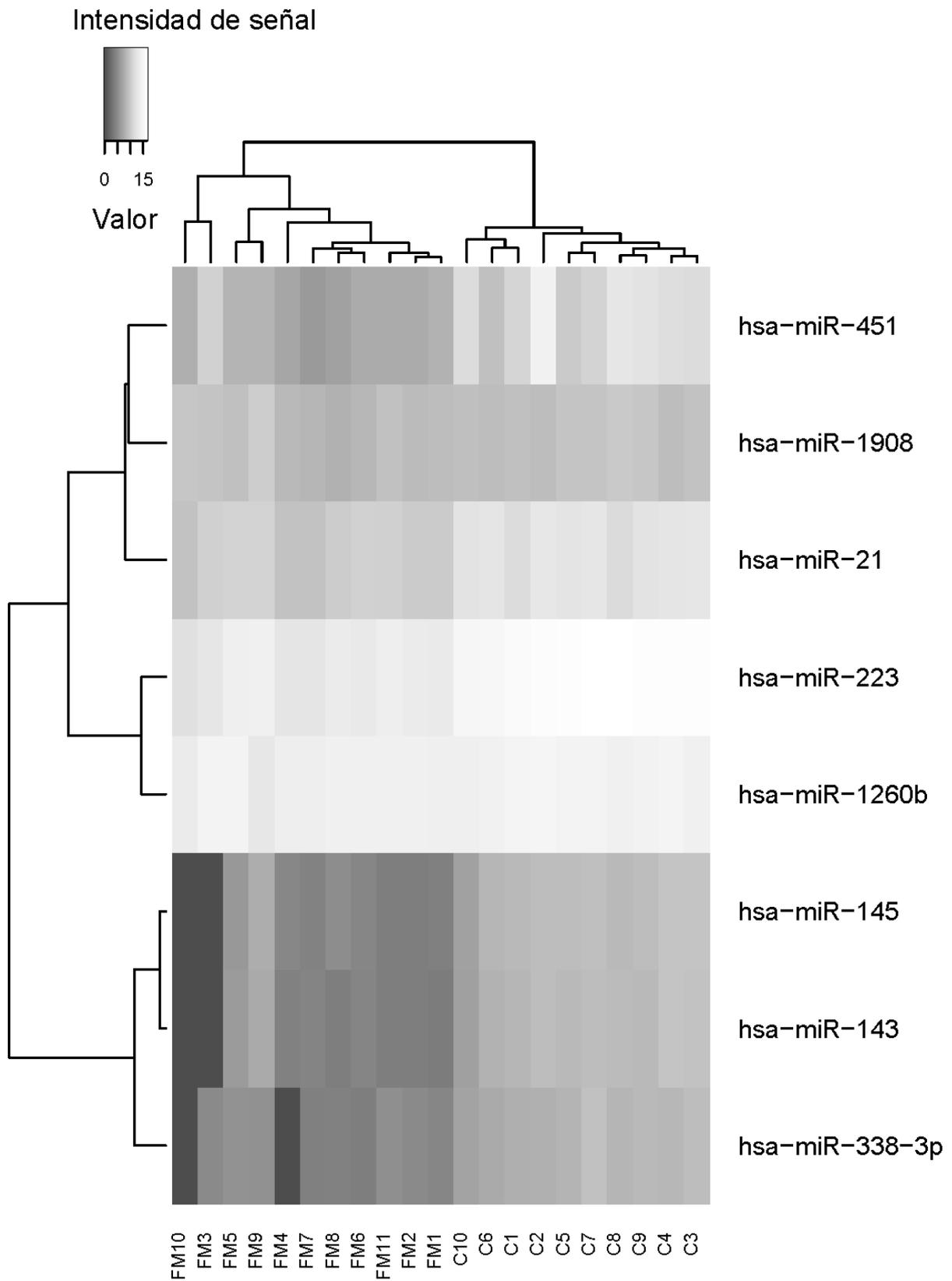


Fig. 2



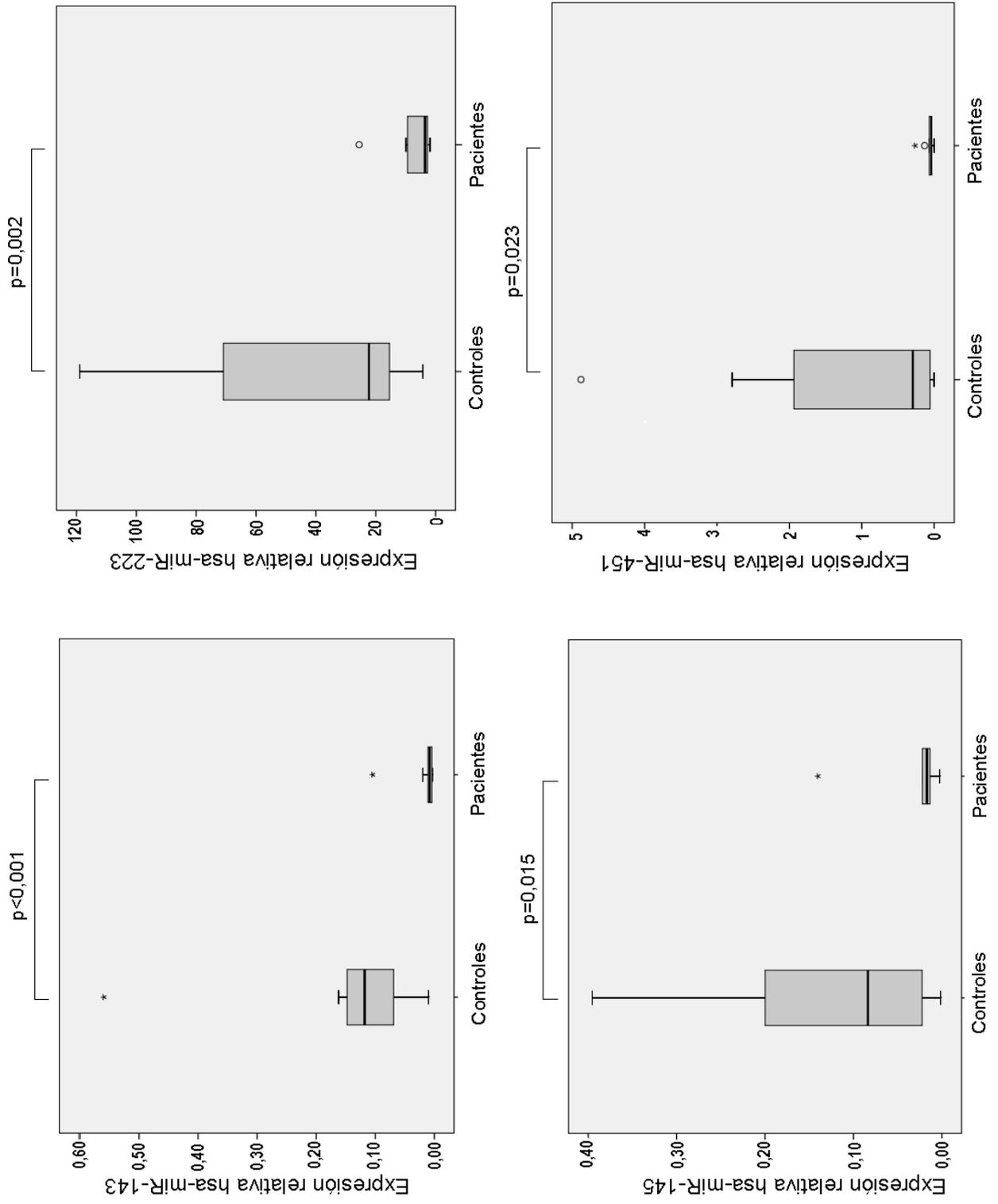
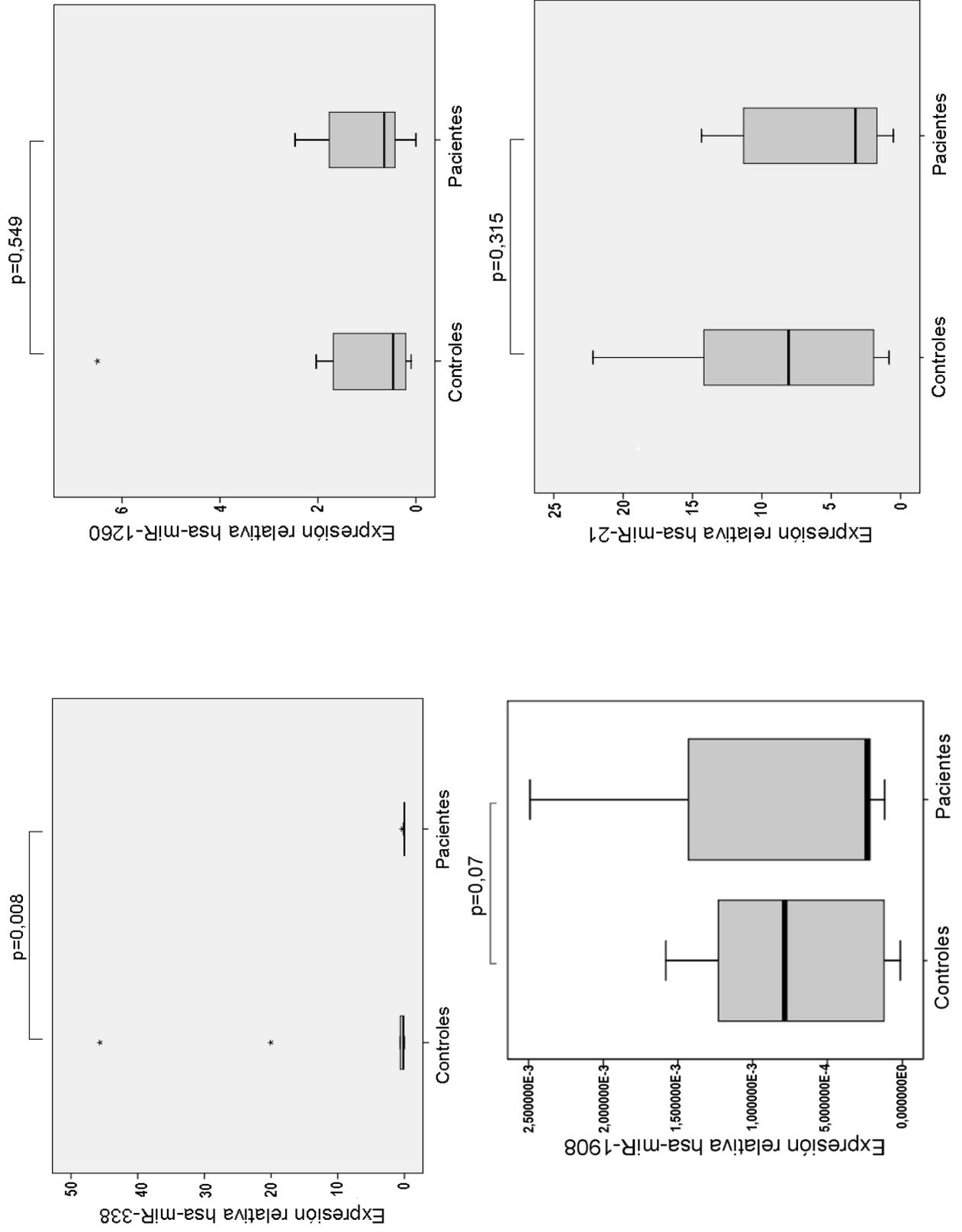
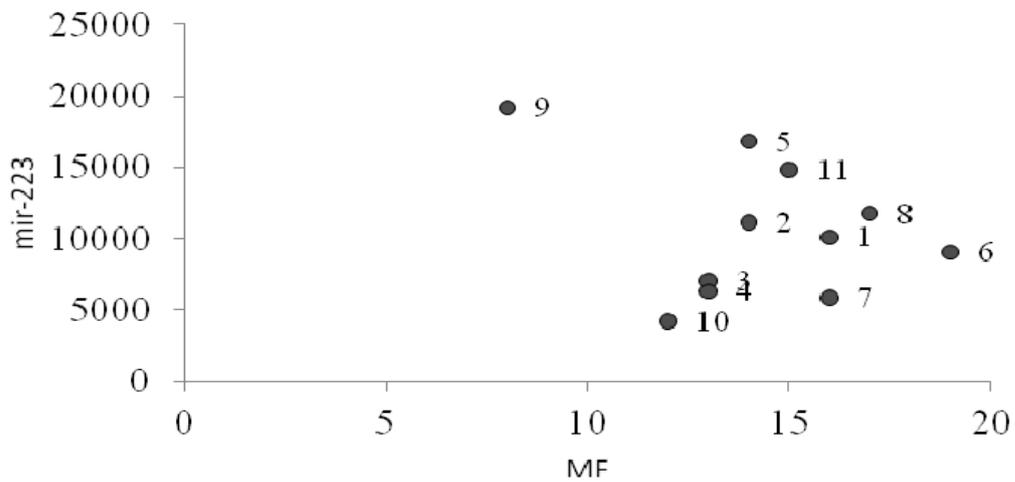
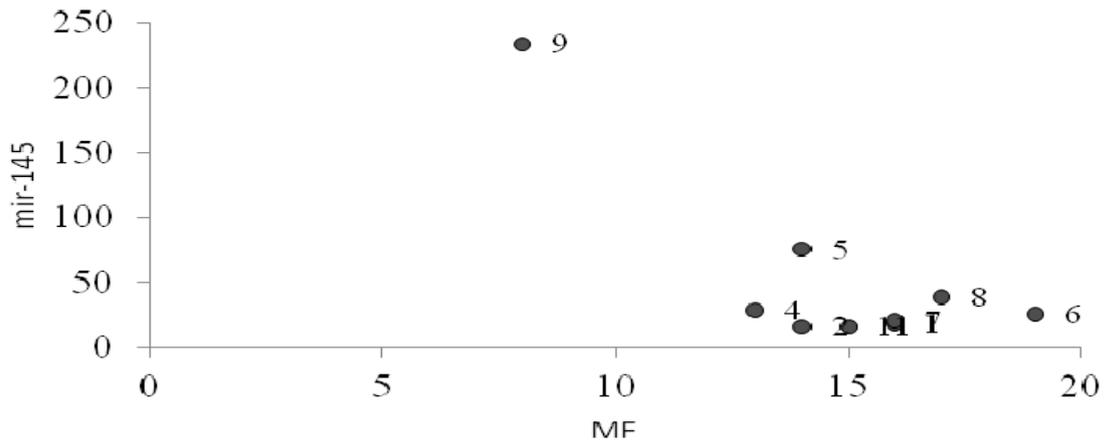
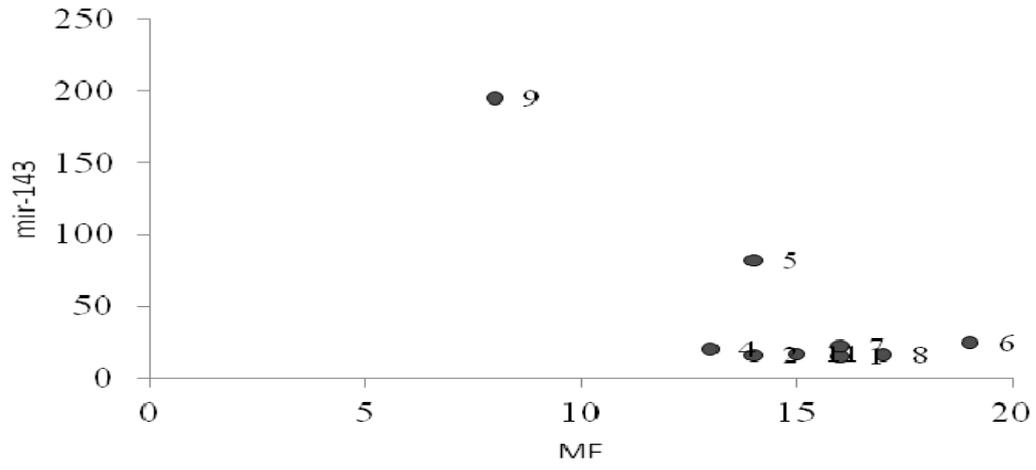


Fig. 3



**Fig. 3**  
**(cont.)**

**Fig. 4**



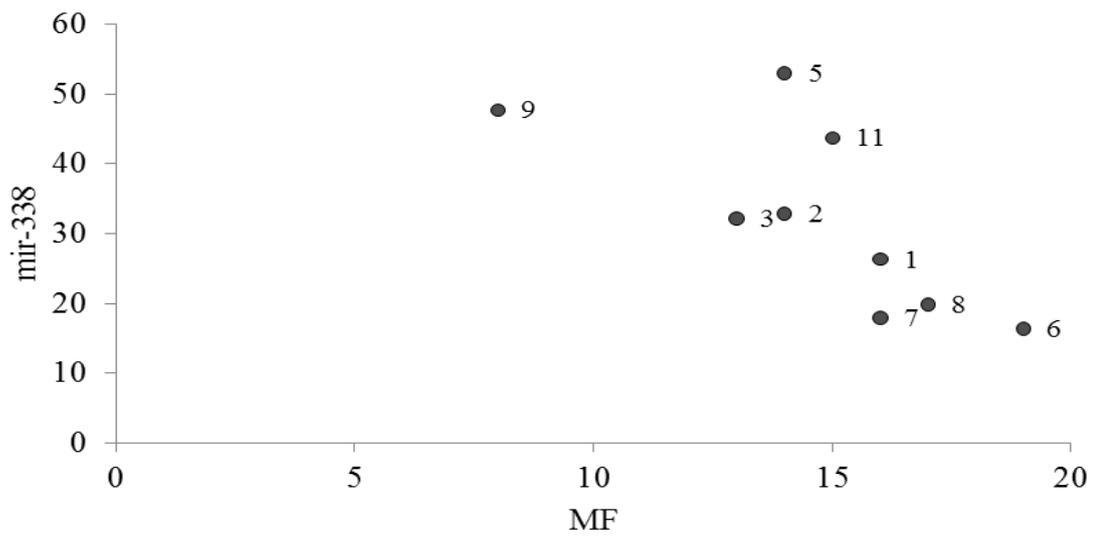
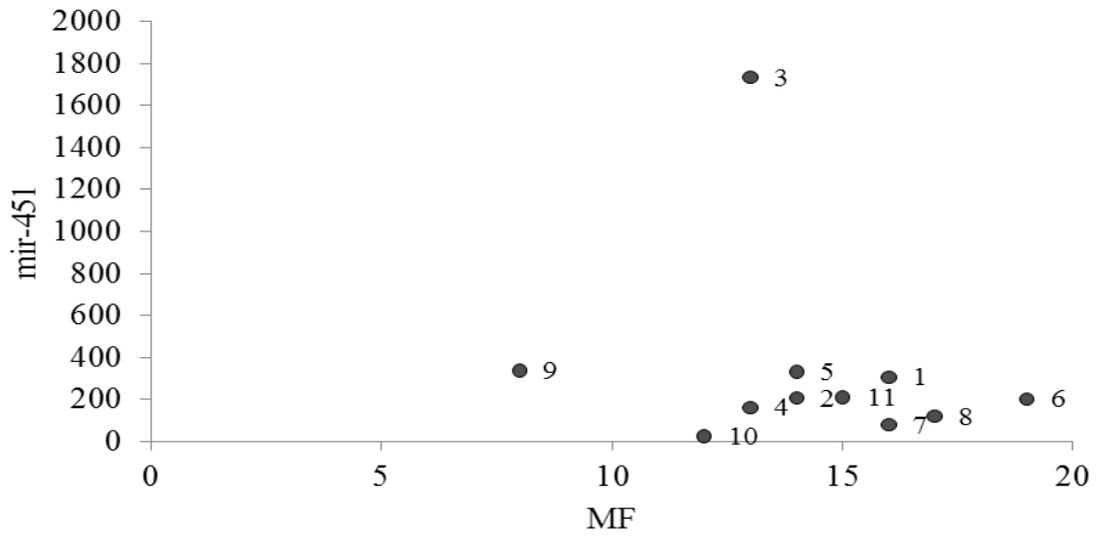
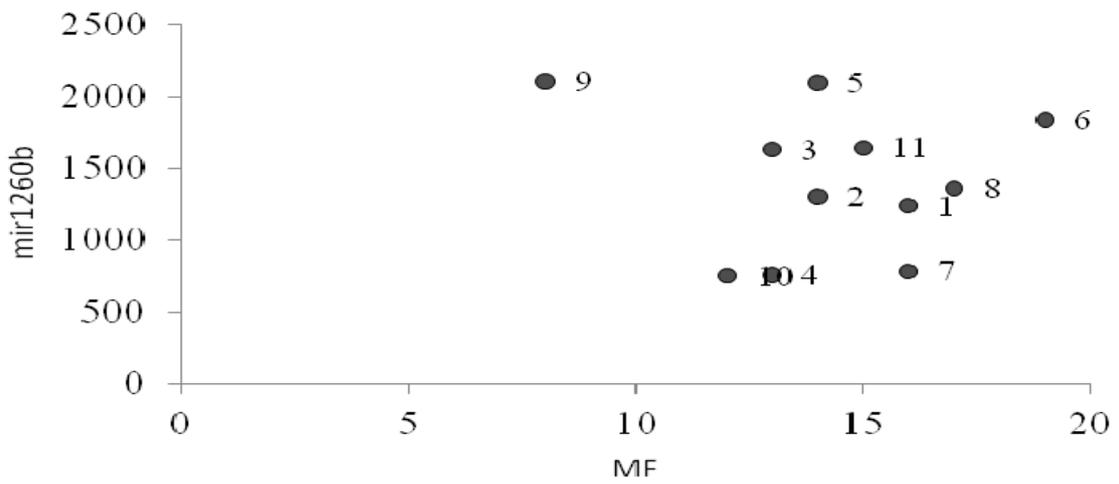
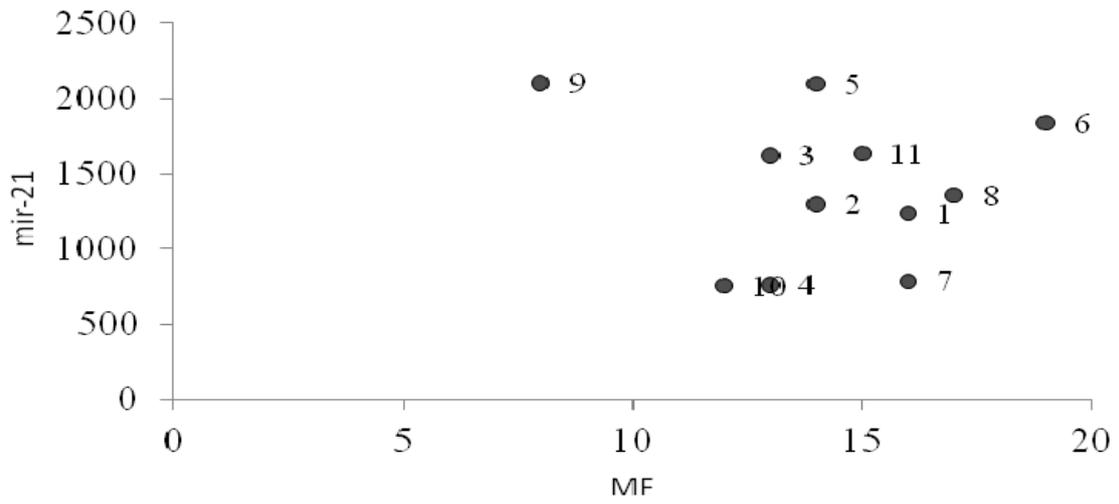


Fig. 4 (cont.)



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Católica de Valencia "San Vicente Mártir"

<120> Método de diagnóstico de fibromialgia basado en microRNAs

<130> P-101332

<160> 16

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia del hsa-miR-223-3p maduro

<400> 1

ugucaguuug ucaaaauaccc ca 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia del hsa-miR-451a maduro

<400> 2

aaaccguuac cauuacugag uu 22

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia del hsa-miR-338-3p maduro

<400> 3

uccagcauca gugauuuugu ug 22

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia del hsa-miR-143-3p maduro

<400> 4

ugagaugaag cacuguagcu c 21

<210> 5

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia del hsa-miR-145-5p maduro

<400> 5

guccaguuuu cccaggauc ccu 23

<210> 6

<211> 22

# ES 2 558 262 A1

<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Secuencia del hsa-miR21-5p maduro

<400> 6  
uagcuauca gacugaugu ga 22

<210> 7  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Secuencia del hsa-miR1908-5p maduro

<400> 7  
cggcggggac ggcgauuggu c 21

<210> 8  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Secuencia del hsa-miR-1260b maduro

<400> 8  
aucccaccac ugccaccau 19

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo para amplificación de cDNA de hsa-miR-223-3p

<400> 9  
tgtcagttg tcaaatacc 20

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo para amplificación de cDNA de hsa-miR-451a

<400> 10  
aaaccgttac cattactgag 20

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo para amplificación de cDNA de hsa-miR-338-3p

<400> 11  
tccagcatca gtgatttgt 20

<210> 12  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

# ES 2 558 262 A1

<220>  
<223> Cebador directo para amplificación de cDNA de hsa-miR143-3p

<400> 12  
tgagatgaag cactgtagc 19

<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo para amplificación de cDNA de hsa-miR-145-5p

<400> 13  
gtccagttt cccaggaatc c 21

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo para amplificación de cDNA de hsa-miR-21-5p

<400> 14  
tagcttatca gactgatgtt 20

<210> 15  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo para amplificación de cDNA de hsa-miR-1908-5p

<400> 15  
cggcggggac ggcgattg 18

<210> 16  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo para amplificación de cDNA de hsa-miR-1260b

<400> 16  
atcccaccac tgccacc 17



- ②① N.º solicitud: 201431177  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.08.2014  
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MENA-DURAN A V, <i>et al.</i> MicroRNA expression profile in fibromialgia patients: a pilot matched case control study. <i>Annals of the Rheumatic Diseases</i> Junio 2013 VOL: 72 No: Suppl. 3 Pág: 715 ISSN 0003-4967 (Impreso) ISSN 1468-2060 (Electrónico). Ver todo el documento.	1-21
A	BJERSING J L, <i>et al.</i> Profile of cerebrospinal microRNAs in fibromialgia. <i>PloS one United States</i> 25.10.2013 VOL: 8 No: 10 Pág: e78762 ISSN 1932-6203 (Electrónico) Doi: doi:10.1371/journal.pone.0078762 pubmed:24205312. Ver todo el documento.	1-21
A	LOVENDORF M B, <i>et al.</i> MicroRNA-223 and miR-143 are important systemic biomarkers for disease activity in psoriasis. <i>Journal of dermatological science Netherlands</i> 21.05.2014 (en línea) VOL: 75 No: 2 Págs: 133-139 ISSN 1873-569X (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.jdermsci.2014.05.005 pubmed:24909097. Ver todo el documento.	1-21
A	CARLSEN A L, <i>et al.</i> Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. <i>Arthritis and rheumatism United States</i> Mayo 2013 VOL: 65 No: 5 Págs: 1324-1334 ISSN 1529-0131 (Electrónico) Doi: doi:10.1002/art.37890 pubmed:23401079. Ver todo el documento.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
03.07.2015

Examinador  
B. Pérez Esteban

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q1/68** (2006.01)

**A61K31/7105** (2006.01)

**A61P21/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPIAP, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.07.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-21	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-21	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MENA-DURAN A V, <i>et al.</i> Annals of the Rheumatic Diseases Junio 2013 VOL: 72 No: Suppl. 3 Pág: 715 ISSN 0003-4967 (Impreso) ISSN 1468-2060 (Electrónico).	Junio 2013
D02	BJERSING J L, <i>et al.</i> PloS one United States 25.10.2013 VOL: 8 No: 10 Pág: e78762 ISSN 1932-6203 (Electrónico) Doi: doi:10.1371/journal.pone.0078762 pubmed:24205312.	25.10.2013
D03	LOVENDORF M B, <i>et al.</i> Journal of dermatological science Netherlands 21.05.2014 (en línea) VOL: 75 No: 2 Págs: 133-139 ISSN 1873-569X (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.jdermsci.2014.05.005 pubmed:24909097.	21.05.2014
D04	CARLSEN A L, <i>et al.</i> Arthritis and rheumatism United States Mayo 2013 VOL: 65 No: 5 Págs: 1324-1334 ISSN 1529-0131 (Electrónico) Doi: doi:10.1002/art.37890 pubmed:23401079.	Mayo 2013

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método para diagnosticar fibromialgia basado en la medida de varios microARNs (miRNAs) en muestras de sangre periférica, concretamente en células mononucleares. Concretamente, el método consiste en medir el nivel de los miRNAs miR-223 y miR-451 y, si estos niveles son menores que un valor de referencia, se decide que el paciente padece la enfermedad. Además, el método incluye la medición de los miRNAs miR-338, miR-143 y miR-145 (de modo que la presencia de niveles bajos de al menos uno de estos miRNAs está asociada a fibromialgia), y la de los miRNAs control miR-21, miR-1908 y miR-1260b (de los que al menos uno no debe presentar niveles menores que un valor de referencia para decidir que el paciente sufre fibromialgia). Además, el método permite diagnosticar que el paciente tiene niveles bajos de fatiga mental si sólo los niveles de los miRNAs miR-451 y miR-338 son menores que el valor de referencia, y los niveles al menos dos de los tres miRNAs control no son menores que sus valores de referencia.

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que describa el método de la solicitud, ni documentos que, solos o en combinación con otros, pudieran llevar al experto en la materia de forma evidente al objeto de la invención, por lo que las reivindicaciones 1 a 21 de la solicitud son nuevas y tienen actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986 de Patentes, respectivamente.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se describe un estudio que muestra la relación entre los niveles reducidos de 4 miRNAs en células mononucleares de sangre periférica de individuos que padecen fibromialgia respecto a los niveles detectados en donantes sanos. Por tanto, en este trabajo se estaría empleando el método de la invención, pero, puesto que en el documento citado no se indican los miRNAs empleados en el análisis, no se puede concluir que D01 afecte la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 21 de la presente solicitud.

En cuanto al documento D02, que también divulga el uso de miRNAs como sistema de diagnóstico de fibromialgia, y que asocia niveles bajos de nueve miRNAs al padecimiento de la enfermedad, tampoco se considera que afecte la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 21 de la solicitud, puesto que no se miden los mismos miRNAs en el método de D02 y en el método de la invención (aunque 2 de ellos coinciden, miR-145 y miR-223). Además, la principal diferencia entre la solicitud y el documento D02 radica en las muestras empleadas para analizar los miRNAs, ya que en D02 se utiliza líquido cefalorraquídeo, mientras que en la solicitud se usan muestras de sangre periférica del paciente, lo que supone una ventaja respecto a estado de la técnica, pues se disminuye la complejidad en la obtención de la muestra y favorece la automatización del diagnóstico.

Los documentos D03 y D04 son ejemplos de documentos del estado de la técnica que describen métodos que solucionan este mismo problema técnico, ya que emplean la medición de los niveles de miRNAs en sangre periférica (sangre total, plasma o células mononucleares) para diagnosticar distintas enfermedades. Concretamente, se asocian los niveles de varios miRNAs (entre otros, miR-223 y miR-143) a psoriasis y lupus eritematoso sistémico. A pesar de que ambas enfermedades cursan frecuentemente asociadas a la fibromialgia, no resulta evidente deducir que la información divulgada en estos dos documentos pudiera conducir al experto en la materia al método de la solicitud, por lo que las reivindicaciones 1 a 21 de la presente solicitud tienen novedad y actividad inventiva a la luz de la información descrita en los documentos D03 y D04, según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986 de Patentes, respectivamente.