

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 245**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2012 PCT/IB2012/001702**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO2013011378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12761808 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2732052**

54 Título: **Perfilado de microARN para el diagnóstico en linfoma cutáneo de células T (CTCL)**

30 Prioridad:

**15.07.2011 US 201161508231 P**  
**18.07.2011 US 201161508838 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.04.2017**

73 Titular/es:

**LEO PHARMA A/S (20.0%)**  
**Industriparken 55**  
**2750 Ballerup, DK;**  
**COPENHAGEN UNIVERSITY (20.0%);**  
**RIGSHOSPITALET (20.0%);**  
**GENTOFTE HOSPITAL (20.0%) y**  
**EXIQON A/S (20.0%)**

72 Inventor/es:

**RALFKIAER, ULRIK;**  
**HAGEDORN, PETER;**  
**AHLER, CHARLOTTE, BUSCH;**  
**GEISLER, CARSTEN;**  
**WOETMANN, ANDERS;**  
**SKOV, LONE;**  
**ØDUM, NIELS, FEENTVED y**  
**RALFKIER, ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 610 245 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Perfilado de microARN para el diagnóstico en linfoma cutáneo de células T (CTCL).

### 5 CAMPO DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico del cáncer. En particular, la invención se refiere a una signatura de expresión de microARN que permite discriminar muestras de piel (inflamatorias) no malignas de muestras de piel de linfomas cutáneos de células T (CTCL).

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

Los linfomas cutáneos de células T (CTCL) son los linfomas primarios de la piel más frecuentes, con micosis fungoide (MF) siendo la forma clínica más prevalente que supone aproximadamente el 60% de los nuevos casos (Trautinger, 2006).

15

En fases tempranas de la enfermedad, que pueden durar varios años, la MF se presenta como parches de piel eritematosa planos que recuerdan a enfermedades inflamatorias tales como dermatitis o psoriasis. En las fases tardías, las lesiones de MF forman gradualmente placas y tumores manifiestos y pueden diseminarse a los ganglios linfáticos y los órganos internos. Las lesiones cutáneas tempranas de esta enfermedad contienen numerosas células inflamatorias, incluyendo una gran cantidad de células T con un fenotipo normal, así como una pequeña población de células T con un fenotipo maligno.

20

El infiltrado consiste principalmente en células T cooperadoras 1 (Th1) no malignas, células T reguladoras (Treg), y células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, que, en cierta medida, parecen controlar las células T malignas (Lee, 1999; Gjerdrum, 2007). Las células T malignas normalmente muestran el fenotipo de células T CD4<sup>+</sup> de memoria maduras y son normalmente de origen clonal (Rosen, 2006). Las células T con un fenotipo maligno se caracterizan por epidermotropismo y están presentes preferentemente en las partes superiores de la piel, mientras que las células T con un fenotipo normal se detectan principalmente en las partes inferiores de la dermis. Las células T epidérmicas se encuentran a veces en patrones de micro-abscesos de Pautrier, que son colecciones de células T adherentes a dendritas de células de Langerhans. Durante el desarrollo de la enfermedad, el epidermotropismo se pierde gradualmente concomitante con un incremento de células T infiltrantes malignas, y una disminución de no malignas.

25

30

La etiología de CTCL aún se entiende mal, y se han propuesto exposiciones ocupacionales, agentes infecciosos y mutaciones genéticas como factores etiológicos, pero no se ha proporcionado ninguna prueba de causalidad (Dereure, 2002). En su lugar, una expresión y función aberrantes de factores de transcripción y reguladores de la transducción de señales es un elemento característico de CTCL. Por consiguiente, se ha formulado la hipótesis de que una regulación disfuncional de moléculas de señal y citocinas desempeña un papel clave en la transformación maligna, y modificaciones epigenéticas tales como metilación de genes aberrante y desacetilación de histona están claramente implicados en la patogenia de CTCL (Doorn, 2009; Girardi, 2004).

35

40

El diagnóstico temprano es difícil debido al gran parecido clínico e histológico con enfermedades inflamatorias benignas tales como dermatitis o psoriasis. Un diagnóstico definitivo a partir de una biopsia de piel requiere la presencia de linfocitos enrollados, un infiltrado dérmico similar a una banda, e infiltraciones epidérmicas con abscesos de Pautrier, pero todos estos elementos a menudo no están presentes en las fases tempranas y el panorama histológico es a menudo difícil de interpretar. Los exámenes histológicos pueden suplementarse a menudo mediante marcadores sustitutos tales como expresión baja de CD7 e intermedia de CD4 y clonalidad del receptor de células T, ninguno de los cuales es específico para CTCL. Además, estos procedimientos son laboriosos y no existe ningún marcador de enfermedad definitivo. Por consiguiente, un diagnóstico definitivo puede requerir la revisión de múltiples biopsias durante un periodo de tiempo prolongado por un patólogo experimentado. Por lo tanto, a los pacientes se les deja a menudo en incertidumbre durante un periodo de tiempo prolongado y se les somete a diferentes tipos de tratamientos ineficientes.

45

50

Los microARN (miARN o miR) son una clase abundante de ARN endógenos cortos que actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión génica mediante emparejamiento de bases con sus ARNm diana. Específicamente, los miARN impiden la traducción del ARNm y/o median en la degradación del ARNm diana. Los miARN son ARN de 19-25 nucleótidos (nt) que se procesan a partir de transcritos en horquilla endógenos más largos (Ambros y col. 2003, RNA 9: 277-279). Hasta la fecha, se han identificado más de 6000 miARN en seres humanos, gusanos, moscas de la fruta y plantas, de acuerdo con la publicación de la base de datos de registro de miARN 11.0

55

en abril de 2008, alojada por el instituto Sanger, Reino Unido.

Datos recientes indican que varios miARN se expresan de forma diferencial y posiblemente también están implicados en la patogenia del cáncer (Garzon, 2009)<sup>12</sup>. Por lo tanto, la expresión de miR-21 está regulada positivamente y parece desempeñar un papel en la regulación de la apoptosis en células T malignas obtenidas de pacientes con síndrome de Sezary (SS), una variante leucémica de CTCL. Estos descubrimientos concuerdan con estudios en otros cánceres donde a los miARN se les ha asignado un papel clave en el desarrollo y la metástasis del cáncer. De hecho, miARN específicos están implicados directamente en la transformación maligna, dado que pueden funcionar como oncogenes y supresores de tumores (Krejsgaard, 2009).

10

El diagnóstico temprano de CTCL tiene importantes consecuencias en relación con opciones terapéuticas y la determinación del pronóstico. Desafortunadamente, el diagnóstico temprano de CTCL ha demostrado ser difícil debido a la gran semejanza clínica, patológica e histológica con enfermedades cutáneas inflamatorias benignas. Por consiguiente, existe una necesidad de un diagnóstico de tumores temprano y preciso que permitiría un tratamiento dirigido con modalidades de tratamiento establecidas, tales como quimioterapia o fototerapia tópica.

15

### RESUMEN DE LA INVENCION:

La presente invención proporciona un procedimiento basado en un clasificador de miARN de diagnóstico que permite una clasificación rápida y precisa de muestras de piel como malignas o benignas. Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento para clasificar una muestra de células cutáneas de ensayo procedente de un individuo con una enfermedad cutánea inflamatoria como linfomas cutáneos, tal como se define en la reivindicación 1, que comprende:

detectar niveles de expresión de microARN al menos de uno de miR-155 y miR-326, y tanto miR-203 como miR-205, calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo basándose en un conjunto de datos que comprenden los niveles de expresión de dichos microARN, y clasificar la muestra de células de ensayo como linfomas cutáneos o no basándose en el valor de la puntuación clínica.

### 30 DEFINICIONES

Antes de una descripción de las realizaciones detalladas de la invención, se proporciona una definición de términos específicos relacionados con los aspectos y realizaciones principales de la invención.

Las expresiones "linfoma cutáneo", "linfoma cutáneo de células T", "micosis fungoide" y "síndrome de Sezary" se usan de acuerdo con las directrices de OMS-EORTC tal como se describen (Olsen, 2007; Willemze, 2005; Foss, 2011; Burg, 2005).

Los términos "miR", "miARN" y "microARN" se usan de forma sinónima y se refieren a una clase de ARN no codificantes de aproximadamente 18-25 nucleótidos (nt) de largo derivados de genes endógenos. Estos se procesan a partir de precursores similares a horquillas más largos (aproximadamente 75 nt) denominados pre-miR. Los microARN se ensamblan en complejos denominados miRNP y reconocen sus dianas mediante complementariedad antisentido. Si los microARN coinciden al 100% son su diana, es decir la complementariedad es completa, el ARNm diana es escindido, y el miR actúa como un siRNA. Si la coincidencia es incompleta, es decir la complementariedad es parcial, entonces la traducción del ARNm diana se bloquea.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "let-7b", "miR-103", "miR-155", "miR-184", "miR-191", "miR-203", "miR-205", "miR-24", "miR-299-5p", "miR-326", "miR-34b", "miR-423-5p", "miR-663b", "miR-711" o "miR-718" se refieren a secuencias de miR humanas que se encuentran en la publicación de la base de datos de registro de miR 12.0 o posterior y alojada por el instituto Sanger, Reino Unido, así como sus equivalentes animales. Excepto para miR-711 y miR-718, todos los miR son secuencias de miR humanas nombradas habitualmente mediante el prefijo "hsa-", por ejemplo hsa-miR-155 se refiere al miR-155 humano. miR-711 y miR-718 no se publicaron hasta la publicación de la base de datos de registro 14.0.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "detectar el nivel de un miR" se refiere a la cuantificación de dicho miR. Una manera de cuantificación se describe en los ejemplos, es decir qRT-PCR. Sin embargo, el miR puede cuantificarse de múltiples otras maneras, por ejemplo mediante matrices, northern blots, dot blots, ensayos de protección con ARNasa, espectroscopía de masas cuantitativa o diversos procedimientos basados en PCR cuantitativa tales como el ensayo TaqMan o el ensayo UniRT usados en los ejemplos.

El término "expresión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la transcripción y/o acumulación de moléculas de ARN dentro de una célula.

5 En el presente contexto, las expresiones "nivel de expresión de un miR" y "nivel de un miR" se usan de forma sinónima como una medida de la "cantidad de un miR específico" que es detectada en la muestra. La "cantidad de un miR específico" puede expresarse en medidas absolutas o relativas y se refiere a valores obtenidos mediante procedimientos tanto cuantitativos, como cualitativos. Una medida particularmente preferida de la "cantidad de un miR específico" es el valor de punto de corte (Cp) obtenido mediante qRT-PCR en tiempo real, tal como se describe en los ejemplos. Otra medida preferida de la "cantidad de un miR específico" es el "valor de ciclo umbral (Ct)", valor obtenido del mismo modo mediante qRT-PCR en tiempo real, tal como se describe en los ejemplos. Las medidas de Cp y Ct de la "cantidad de un miR específico" proporcionan medidas aproximadamente similares, véase Bustin, S.A. (ed.) A-Z of quantitative PCR, IUL Biotechnology Series 5 (2004) 882 páginas. Si se selecciona Cp o Ct es en gran medida elección de la máquina a la que está vinculado y en la que se realiza el ensayo. Si la amplificación se realiza en un sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 480 usando el software Roche LC, la cantidad de un miR específico se expresa mediante el Cp. Si la amplificación se realiza en el instrumento de 384 pocillos ABI Prism 7900HT de Applied Biosystems usando el software proporcionado con él, la cantidad de un miR específico se expresa mediante el Ct.

20 El término "nivel" designa cantidades tanto relativas como absolutas de los miR mencionados.

Los términos "Q-PCR" o "q-PCR" se refieren a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. Q-PCR es un procedimiento altamente sensible para cuantificar las cantidades de especies de ADN (y ARN) específicas en una muestra de ensayo. Dado que la cuantificación de ARN mediante la técnica de PCR requiere que el ARN se transcriba de forma inversa, a menudo se denomina "qRT-PCR" o "RT-Q-PCR" para indicar que se usa PCR cuantitativa para cuantificar ARN específicos. Una exhaustiva disquisición de las técnicas de Q-PCR y qRT-PCR pueden encontrarse en Bustin, S.A. (ed.) A-Z of quantitative PCR, IUL Biotechnology Series 5 (2004) 882 páginas.

"UniRT" es un novedoso procedimiento de Q-PCR. El procedimiento se describe en el ejemplo 4 y en la solicitud de patente internacional WO 2010/085966.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN:

En el presente estudio, se usaron micromatrices para un cribado inicial de miARN con una potencial capacidad de distinguir entre trastornos cutáneos inflamatorios malignos (CTCL) y benignos tales como psoriasis, dermatitis atópica, y dermatitis de contacto. Se identificaron cinco miARN (miR-203, miR-205, miR-326, miR-663b y miR-711), que discriminaban con elevada precisión (>90%) entre afecciones malignas y benignas en un total de 198 pacientes incluyendo un conjunto de entrenamiento inicial de 90 pacientes, un conjunto de ensayo de 58 pacientes y una cohorte independiente de 50 pacientes, ejemplo 1, figura 1. De forma importante, el patrón de expresión de cuatro de cinco miARN (miR-203, miR-205, miR-326 y miR-663b) se verificó usando qRT-PCR en muestras de ARN de 103 pacientes. Por consiguiente, una realización de la presente invención, es un procedimiento para clasificar una muestra de células cutáneas de ensayo procedente de un individuo con una enfermedad cutánea inflamatoria como linfomas cutáneos que comprende detectar niveles de expresión de microARN (miR) de una selección de miR que comprenden por ejemplo miR-326, miR-203, miR-205 y miR-663b en la muestra de células cutáneas de ensayo, calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo basándose en un conjunto de datos que comprende los niveles de expresión de dichos microARN, y clasificar la muestra de células de ensayo como linfomas cutáneos o no, basándose en el valor de la puntuación clínica.

Recientes estudios en subpoblaciones de pacientes de CTCL identificaron miR-155 como expresado de forma diferente en pacientes de síndrome de Sezary (SS) y pacientes de micosis fungoide (MF) avanzada (fase tumoral), respectivamente (Fits, 2011; Kester, 2011). De forma interesante, solamente se pudieron verificar los datos de expresión de miR-155 mediante la técnica qRT-PCR. Sin embargo, con respecto a miR-155 se pudieron confirmar y ampliar los descubrimientos de van Kester y col. Además, los resultados de qRT-PCR mostraron que miR-155 era uno de los microARN expresados de forma más significativamente diferencial en CTCL.

Por lo tanto, una realización de la presente invención es un procedimiento donde los niveles de microARN miR-155, miR-326, miR-203, miR-205 y miR-663b se detectan y se usan para calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo.

Usando el algoritmo del centroide reducido más cercano en datos de qRT-PCR, miR-155, miR-203 y miR-205 se identificaron como el conjunto más discriminante de miARN, véase el ejemplo 3. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, los niveles de miR-155 y tanto miR-203 como miR-205 se detectan y se usan para calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo.

5

El ejemplo 3, figura 3B, muestra que la expresión diferencial también se confirmó claramente para miR-203, miR-205 y miR-326 con valores P por debajo de  $10^{-11}$ . Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, los niveles de microARN miR-326 y tanto miR-203 como miR-205 se detectan y se usan para calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo.

10

Dado que miR-155 y miR-326 son los 2 miR más regulados positivamente, en biopsias de linfoma cutáneo, una realización preferida adicional de la presente invención es un procedimiento que comprende detectar los niveles de miR-326 y tanto miR-203 como miR-205 y usar estos datos para calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo.

15

En una realización adicional más del presente procedimiento, los niveles de microARN miR-155, miR-326, miR-203 y miR-205 se detectan y se usan para calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo.

20

Los linfomas cutáneos de células T (CTCL) son los linfomas primarios de la piel más frecuentes, por lo tanto una realización preferida adicional de la presente invención es un procedimiento donde el procedimiento se usa para diferenciar muestras de piel de ensayo benignas y muestras de piel de ensayo donde el linfoma cutáneo es linfoma cutáneo de células T (CTCL).

25

De acuerdo con la invención, la puntuación clínica (S) puede calcularse de una serie de maneras diferentes. De forma importante, cuando la puntuación se calcula como la diferencia entre el valor de punto de corte (Cp) determinado mediante qRT-PCR de miR-155 y el Cp promedio de miR-203 y miR-205, se descubrió que la puntuación distingue pacientes con CTCL de enfermedades cutáneas benignas con una sensibilidad, especificidad y precisión de clasificación muy altas (95%), véase el ejemplo 3, figura 7. Por lo tanto, en una realización, la puntuación clínica se calcula como una relación del nivel de expresión de miR-155 y los niveles de expresión promedio de miR-203 y miR-205.

30

Tal como se ve en el ejemplo 3 (figura 3B) la expresión diferencial se confirmó claramente para miR-203, miR-205 y miR-326 con valores P por debajo de  $10^{-13}$ . Por consiguiente, en otra realización, la puntuación clínica se calcula como una relación del nivel de expresión de miR-326 y los niveles de expresión promedio de miR-203 y miR-205.

35

En aún una realización adicional, la puntuación clínica se calcula como una relación del nivel de expresión de miR-155 y miR-326 con respecto a los niveles de expresión promedio de miR-203 y miR-205.

40

Los miR pueden cuantificarse de una serie de maneras, por ejemplo mediante matrices, northern blots, dot blots, ensayos de protección con ARNasa, espectroscopía de masas cuantitativa o diversas técnicas basadas en PCR cuantitativa.

45

La enzima usada en la técnica de PCR es, en la mayoría de los aspectos, una ADN polimerasa resistente a la temperatura, por lo tanto con el fin de proporcionar la plantilla de ADN necesaria para que la ADN polimerasa actúe sobre ella, los ARN son copiados en su complemento de ADN mediante la acción de una transcriptasa inversa, antes de someterse a PCR. En las posteriores etapas del procedimiento, las copias de ADN (a menudo denominadas ADNc) se someten a una PCR cuantitativa (q-PCR). El procedimiento colectivo de transcribir de forma inversa el ARN en una muestra y posteriormente cuantificarlo mediante q-PCR se denomina reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa, o "qRT-PCR". Una exhaustiva disquisición de las técnicas de Q-PCR y qRT-PCR pueden encontrarse en Bustin, S.A. (ed.) A-Z of quantitative PCR, IUL Biotechnology Series 5 (2004) 882 páginas.

50

55

Hoy, la técnica con mucho más sensible, específica y cómoda para cuantificar microARN es la técnica de qRT-PCR. Por lo tanto, en la realización más preferida del presente procedimiento, los niveles de expresión de los microARN se determinan mediante qRT-PCR, y un ejemplo preferido de un procedimiento de qRT-PCR es el procedimiento UniRT descrito en el ejemplo 4.

Sin embargo, se obtuvieron resultados similares usando el ensayo de qRT-PCR TaqMan de ABI descrito en el ejemplo 6, figura 6.

Aunque por ejemplo las relaciones:

$$\frac{(\text{nivel de miR 155})}{\left(\frac{\text{nivel de miR 203}}{2} + \frac{\text{nivel de miR 205}}{2}\right)}$$

$$\frac{(\text{nivel de miR 326})}{\left(\frac{\text{nivel de miR 203}}{2} + \frac{\text{nivel de miR 205}}{2}\right)}$$

$$\frac{((\text{nivel de miR155}) + (\text{nivel de miR326}))/2}{((\text{nivel de miR203}) + (\text{nivel de miR205}))/2}$$

$$\frac{((\text{nivel de miR155}) + (\text{nivel de miR326}) + (\text{nivel de miR663b}))/3}{((\text{nivel de miR203}) + (\text{nivel de miR205}))/2}$$

15 son todas estimadores útiles para S, la lectura de un instrumento de QPCR en tiempo real típico es, a menudo, el llamado valor de Cp (punto de corte) o el valor de ciclo umbral (Ct) ambos de los cuales pueden obtenerse mediante qRT-PCR en tiempo real. El valor tanto de Ct como de Cp se refiere al nivel de, por ejemplo, un miR específico, mediante la relación:

$$20 \quad \text{nivel de expresión (lineal) de miRx} \sim 2^{-Cp(miRx)}$$

Donde  $Cp(miRx)$  designa la lectura de Cp del instrumento de QPCR en tiempo real que detecta específicamente un miR específico llamado miRx. El ejemplo 5 describe dicho ensayo en detalle.

25 Por consiguiente, cuando los valores de Cp se usan como cuantificadores de los niveles de miR, la expresión

$$\frac{(\text{nivel de miR 155})}{\left(\frac{\text{nivel de miR 203}}{2} + \frac{\text{nivel de miR 205}}{2}\right)}$$

30 es equivalente a:

$$+Cp(miR 155) - Cp(miR203)/2 - Cp(miR205)/2$$

35 Nótese que cuanto menos miR haya en la muestra, más ciclos hay que realizar antes de que se alcance el punto de corte o el ciclo umbral. Es decir, cuanto mayor sea el valor de Cp (o Ct), menos miR está presente en la muestra.

Constatar que los linfomas cutáneos de la piel y particularmente linfomas cutáneos de células T (CTCL) se caracterizan por un nivel de expresión de miR-155 (y miR-326) incrementado y una expresión reducida de miR-203 y miR-205 con respecto al nivel en piel normal o benigna, hace posible formular una amplia gama de estimadores de la puntuación clínica S. La regresión logística es un procedimiento usado ampliamente para generar los mejores modelos lineales de ajuste de datos. Por ejemplo la puntuación clínica, S, puede calcularse de la siguiente manera:

40  $S = X * C(miR-155) + Y * C(miR-205) + Z * C(miR-203)$ , donde "C" es el valor de ciclo umbral (Ct) o el valor de punto de corte (Cp), y donde X, Y y Z son coeficientes determinados mediante regresión lineal, con la condición de que

$X + Y + Z = 0$ , con el fin de minimizar el error de clasificación.

Del mismo modo, una puntuación clínica,  $S$ , puede calcularse como:  $S = X \cdot C(\text{miR-326}) + Y \cdot C(\text{miR-205}) + Z \cdot C(\text{miR-203})$ , donde " $C$ " es el valor de ciclo umbral ( $C_t$ ) o el valor de punto de corte ( $C_p$ ), y donde  $X$ ,  $Y$  y  $Z$  son coeficientes determinados mediante regresión lineal, con la condición de que  $X + Y + Z = 0$ , con el fin de minimizar el error de clasificación.

O expresada en términos más generales, la puntuación clínica puede calcularse como:  $S = X \cdot C(\text{miR-155}) + Y \cdot C(\text{miR-326}) + Z \cdot C(\text{miR-6.63b}) + W \cdot C(\text{miR-203}) + Q \cdot C(\text{miR-205})$ , donde " $C$ " es el valor de ciclo umbral ( $C_t$ ) o el valor de punto de corte ( $C_p$ ), y donde  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ,  $W$  y  $Q$  son coeficientes determinados mediante regresión lineal, con la condición de que  $X+Y+Z+W+Q = 0$ , con el fin de minimizar el error de clasificación.

Tal como se pone de manifiesto en el ejemplo 3 y se ilustra en la figura 4 un estimador particularmente útil es  $S = C(\text{miR-155}) - C(\text{miR-205})/2 - C(\text{miR-203})/2$ , donde " $C$ " es el valor de ciclo umbral ( $C_t$ ) o el valor de punto de corte ( $C_p$ ). Por consiguiente, la realización más preferida de la invención es la realización donde la puntuación clínica,  $S$ , se calcula como  $S = C(\text{miR-155}) - C(\text{miR-205})/2 - C(\text{miR-203})/2$ , donde " $C$ " es el valor de ciclo umbral ( $C_t$ ).

Usando este estimador para la puntuación clínica, es posible formular valores umbral, véase el ejemplo 3 y la figura 4A.

Por consiguiente, en una realización de la invención, la puntuación clínica,  $S$ , se calcula como  $S = C(\text{miR-155}) - C(\text{miR-205})/2 - C(\text{miR-203})/2$ , y " $C$ " es el valor de punto de corte ( $C_p$ ) y donde, cuando la puntuación clínica " $S$ " es inferior a aproximadamente 6,5, en particular inferior a 6,0, el ensayo indica que la muestra de células cutáneas de ensayo es linfoma cutáneo de células T, y donde, cuando la puntuación clínica " $S$ " es superior a aproximadamente 6,5, en particular superior a aproximadamente 7,0, el ensayo indica que la muestra de células cutáneas de ensayo es benigna.

Apoyándose en los mismos principios, la puntuación clínica puede calcularse como:  $S = C(\text{miR-326}) - C(\text{miR-205})/2 - C(\text{miR-203})/2$  donde " $C$ " es el valor de ciclo umbral ( $C_t$ ) o el valor de punto de corte ( $C_p$ ) o incluso  $S = C(\text{miR-155})/3 + C(\text{miR-326})/3 + C(\text{miR-663b})/3 - C(\text{miR-205})/2 - C(\text{miR-203})/2$  donde " $C$ " es el valor de ciclo umbral ( $C_t$ ) o el valor de punto de corte ( $C_p$ ).

## LEYENDAS

**Figura 1. Perfiles de expresión en conjunto de entrenamiento para miARN altamente significativos.** Se analizaron mediciones de micromatriz de 688 miARN en el conjunto de entrenamiento de 90 muestras con prueba de la  $t$  para descubrir diferencias de la expresión entre muestras de sujetos con CTCL y las de enfermedades cutáneas inflamatorias benignas o sujetos individuales sanos (BDN). Los 27 miARN que mostraban diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$  corregido por Bonferroni) y fuertes (al menos 50% de cambio) se presentan en el mapa de calor. Las muestras se disponen en columnas, el miARN en filas, y ambos se agrupan jerárquicamente usando distancia Euclídea con encadenamiento de nodos promedio. Las sombras de negro a blanco indican expresión relativa incrementada; las sombras negras indican expresión reducida; el gris indica mediana de la expresión. Los 5 microARN inducidos o reprimidos de forma más significativa se muestran en negrita.

**Figura 2. Clasificación de CTCL y BDN.** A. Gráfico del análisis del componente principal (PCA) de muestras procedentes de sujetos con CTCL (gris claro) y las de sujetos BDN (gris oscuro) en el conjunto de entrenamiento basándose en el perfil de 5-microARN identificado mediante el algoritmo de centroides reducidos más cercanos (NSC). Los porcentajes indican la varianza porcentual explicada por ese componente. B. Ejecución de la clasificación en el conjunto de entrenamiento usando el algoritmo NSC. Los valores  $P$  se calcularon usando la prueba exacta de Fisher. C. Gráfico de PCA de muestras en el conjunto de ensayo basándose en el perfil de 5 microARN identificado a partir del conjunto de entrenamiento. D. Ejecución de la clasificación en el conjunto de ensayo usando el algoritmo NSC entrenado.

**Figura 3. Clasificador de expresiones de miARN medidas mediante micromatriz y qRT-PCR.** Para cada microARN, las expresiones se agrupan de acuerdo con el tipo de paciente (CTCL y BDN respectivamente), con una pequeña dispersión en el eje  $x$  dentro de cada grupo para permitir una mejor visualización de todas las mediciones. Los valores  $P$  se calcularon usando la prueba de la  $t$ . A. Expresiones medidas mediante micromatriz. B. Expresiones medidas mediante qRT-PCR.

**Figura 4.** Clasificación basada en qRT-PCR de muestras procedentes de pacientes con CTCL y enfermedad cutánea benigna. **A.** Una puntuación de muestras basada en Cp (S) se calculó para cada muestra. Los pacientes se ordenan por valores crecientes de esta puntuación. La línea continua muestra el valor divisorio entre pacientes con CTCL (gris claro) y pacientes con enfermedades cutáneas benignas (gris oscuro). Las líneas de puntos muestran los valores divisorios para la región de baja confianza. **B.** Ejecución de la clasificación usando los valores divisorios definidos en (A). Los valores P se calcularon usando la prueba exacta de Fisher. **C.** Curva característica del operador receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y la especificidad para diversos valores de punto de corte en la puntuación de muestra de las muestras. **D.** Expresión relativa de los tres microARN usados en la clasificación en muestras procedentes de pacientes con CTCL y enfermedad cutánea benigna. Las barras de error indican  $\pm 1$  desviación estándar. El valor de dCp (o  $\Delta C_p$ ) se calcula como  $\Delta C_p = C_p$  de referencia (=control) -  $C_p$ , observado.

**Figura. 5.** Clasificación basada en qRT-PCR de muestras procedentes de pacientes con Micosis Fungoide (MF) en diversas fases de la enfermedad. Una puntuación de muestra basada en Cp (S) se calculó para cada muestra como en la figura 4. Los pacientes se ordenan de acuerdo con las fases clínicas (I a IV) y las líneas continuas indican la puntuación de la muestra media en cada fase. Los pacientes con una puntuación de muestra por debajo de 6,52 están siendo clasificados como CTCL (véase la figura 4).

**Figura 6.** El protocolo UniRT de dos etapas. El principio de la qRT-PCR de un microARN sirve como ejemplo, el ARN a analizar mediante el procedimiento puede ser también cualquier otra pequeña molécula de ARN o incluso un ARNm. La etapa 1 es una reacción en un tubo para todos los microARN presentes en una muestra. La etapa 2 es una qPCR específica de microARN usando pares de cebadores directos e inversos para un microARN específico. Un óvalo indica inserción de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) en cebadores directos e inversos. Cuando el procedimiento se lleva a cabo en la práctica, a los miARN presentes en una muestra se les añaden múltiples colas de poli-A usando una poli(A) polimerasa (**SEQ ID NO: 47**), que añade residuos de adenina al extremo 3' de moléculas de ARN. En segundo lugar, un cebador de extensión (**SEQ ID NO: 48**), que tiene una secuencia de nucleótidos de núcleo poli-T, un motivo degenerado VN o VNN en el extremo 3' y una cola en el extremo 5', hibrida con el miARN con cola poli-A a través de hibridación con la secuencia poli-T de VN o VNN del cebador de extensión, (N=C, G, A y T; V= C, G y A). Este cebador puede denominarse el cebador RT universal. Posteriormente, el cebador de extensión se extiende en una reacción de transcripción inversa usando el miARN como plantilla. Todas estas reacciones se realizan en una reacción en un tubo. El producto de extensión primaria resultante está compuesto por el cebador de extensión y el ADN recién sintetizado, que es ADNc complementario a todo el miARN en la muestra. En la siguiente etapa, se lleva a cabo una PCR específica de miARN. Un cebador directo específico de miARN hibrida con el extremo 3' del ADNc recién sintetizado y la síntesis de la cadena superior se lleva a cabo extendiendo el cebador directo en una reacción de polimerización de ADN usando el producto de extensión primario como plantilla. Un cebador inverso específico de miARN (**SEQ ID NO: 49**) compuesto por una secuencia del extremo 3' específica de miARN, un tramo de poli-T y una cola en el extremo 5' hibrida a continuación con la cadena superior y la cadena inferior se sintetiza mediante extensión del cebador inverso.

**Figura 7.** Expresiones medidas mediante qRT-PCR para los microARN en el clasificador. Para cada microARN, las expresiones se agrupan de acuerdo con el tipo de paciente (BDN y CTCL respectivamente). Dentro de cada grupo, existe una pequeña dispersión en el eje x para permitir una mejor visualización de todas las mediciones.

## 45 EXPERIMENTACIÓN

**Procesamiento de datos de micromatrices** Las señales de las sondas se corrigieron contra el fondo ajustando una convolución de distribuciones normal y exponencial con las intensidades en primer plano usando las intensidades de fondo como covariable (Ritchie, 2007). Se combinaron cuatro puntos de elementos repetitivos técnicos para cada sonda para producir una señal tomando la media logarítmica de base 2 de puntos fiables. Si los cuatro elementos repetitivos para una sonda dada se consideraron no fiables, esa sonda se retiró de análisis adicional. Un vector de datos de referencia R se calculó como la mediana de la señal de cada sonda entre todas las muestras. Para todas las señales de sonda en una muestra dada, representadas por el vector de datos de muestra S, se determinó una curva F mediante regresión polinómica ponderada localmente para proporcionar el mejor ajuste entre S y R (Cleveland, 1992). Un vector de muestra normalizado M se calculó a partir de esto transformándolo con la función F, de modo que  $M = F(S)$ . De esta manera, todas las muestras se normalizaron con la referencia R. Este procedimiento de normalización sigue en gran medida el perfilado en (Rosenfeld, 2008). Puntos de datos remotos (sondas en regiones de intensidad muestreadas escasamente con menos de 15 sondas por unidad de señal) se consideraron ajustadas de forma no fiable mediante este procedimiento y se retiraron antes de análisis adicional.

**Estadísticas del clasificador** La significación de las diferencias en los niveles de expresión se evaluó mediante una prueba de la  $t$  para datos no emparejados bilateral. La predicción de clases se realizó usando clasificación mediante centroide reducido más cercano (Tibshirani, 2002). En resumen, un centroide estandarizado se computa para cada clase como la expresión promedio de cada microARN en cada clase dividido por la desviación estándar dentro de la clase para ese microARN. El perfil de expresión de microARN de una nueva muestra se compara a continuación con cada uno de estos centroides de clase, y la clase, cuyo centroide es el más cercano en distancia Euclídea, es la clase predicha para esa nueva muestra. El algoritmo se entrena reduciendo centroides de clase hacia el centroide global para todas las clases mediante una cantidad umbral que minimiza el error de clasificación errónea según lo determinado a través de validación cruzada de 10 iteraciones en el conjunto de entrenamiento.

### Ejemplo 1

#### Perfilado de expresión de miARN usando micromatrices

Se usaron análisis de micromatrices para realizar perfilado de miARN de 148 biopsias fijadas con formalina e incluidas en parafina. De estas muestras, 63 fueron de pacientes con diversas formas de CTCL y 85 fueron de pacientes con enfermedades cutáneas inflamatorias benignas o individuos sanos (BDN) (Tabla 1).

Se muestrearon biopsias de los pacientes de linfoma durante el periodo 1979-2004 y se recogieron de los archivos en los Departamentos de Patología en el Rigshospitalet, Bispebjerg Hospital, Aalborg Sygehus y Herlev Hospital. De todos los casos de linfoma, las muestras de tejido se revisaron mediante histología e inmunohistoquímica, usando como mínimo cepas CD3, CD4, CD8, CD30, CD56, TIA-1 y Granzyme B. Las muestras se clasificaron a continuación de acuerdo con las directrices de la OMS-EORTC (Olsen, 2007; Willemze, 2005; Foss, 2011; Burg, 2005) y las características clínicas de la cohorte se revisaron para establecer los diagnósticos finales. Biopsias de los pacientes con enfermedades cutáneas benignas y controles sanos se recogieron después del consentimiento informado en el Departamento de Dermato-Alergología, Gentofte Hospital, Departamento de Dermatología, Bispebjerg Hospital, Departamento de Patología, Rigshospitalet, y como parte de ensayos clínicos en LEO Pharma A/S y fueron aprobados por los comités éticos locales (H-B-2009-045 y H-1-2009-111) y la Agencia de Protección de Datos (Datatilsynet J.NR. 2010-41-4303)

El ARN total se aisló de seis secciones de tejido de 10  $\mu\text{m}$  usando el kit de aislamiento de ácido nucleico total RecoverAll (Applied Biosystems/Ambion, EE. UU.) de acuerdo con las directrices del fabricante. La cantidad y calidad del ARN total se comprobaron mediante espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000).

De cada muestra 100 ng de ARN total se etiquetaron con colorante fluorescente Hy3 usando el kit de etiquetado miRCURY LNA Array power labeling (Exiqon, Dinamarca). Todas las muestras se etiquetaron el mismo día con la misma mezcla maestra, con el fin de minimizar la variación técnica. Las muestras etiquetadas con Hy3 se hibridaron con matrices de miRCURY LNA (v11.0) (Exiqon, Dinamarca), que contenían sondas de captura dirigidas a todo el miARN humano registrado en la miRBASE versión 15.0 en el instituto Sanger. La hibridación se realizó durante una noche a 56°C de acuerdo con las especificaciones del fabricante usando una estación de hibridación Tecan HS4800 (Tecan, Austria). Dado que no era posible hibridar todas las matrices de una vez, las muestras se dividieron aleatoriamente en 5 lotes para minimizar la variación de un día a otro en el proceso de hibridación. Después de la hibridación, los portaobjetos de micromatriz se exploraron usando un sistema de exploración de micromatrices Agilent G2565BA (Agilent Technologies, Inc., EE. UU.) a una resolución de 5  $\mu\text{m}$ , y las imágenes en formato TIFF resultantes se analizaron usando el software ImaGene 8.0 en configuración estándar (BioDiscovery, Inc., EE. UU.).

Las señales de la sonda se corrigieron contra el fondo ajustando una convolución de distribuciones normal y exponencial a las intensidades de primer plano usando las intensidades de fondo como covariable (Ritchie, 2007). Se combinaron cuatro puntos de elementos repetitivos técnicos para cada sonda para producir una señal tomando la media logarítmica de base-2 de puntos fiables. Si los cuatro elementos repetitivos para una sonda dada se consideraron no fiables, esa sonda se retiró de análisis adicional. Un vector de datos de referencia  $R$  se calculó como la mediana de la señal de cada sonda entre todas las muestras. Para todas las señales de sonda en una muestra dada, representadas por el vector de datos de muestra  $S$ , se determinó una curva  $F$  mediante regresión polinómica ponderada localmente para proporcionar el mejor ajuste entre  $S$  y  $R$  (Cleveland, 1992; Rosenfeld, 2008). Un vector de muestra normalizado  $M$  se calculó a partir de esto transformándolo con la función  $F$ , de modo que  $M = F(S)$ . De esta manera, todas las muestras se normalizaron con la referencia  $R$ . Este procedimiento de normalización sigue en gran medida el perfilado en (Rosenfeld, 2008). Puntos de datos remotos (sondas en regiones de intensidad muestreadas escasamente con menos de 15 sondas por unidad de señal) se consideraron ajustados de forma no

fiable mediante este procedimiento y se retiraron antes de análisis adicional.

Las muestras se dividieron en 3/5 para entrenamiento (n=90) y 2/5 para ensayo (n=58) con proporción aproximadamente igual de muestras CTCL respecto a BDN en ambos conjuntos. Esta división sigue los cinco lotes de producción de micromatrices usadas en el estudio (tabla 1). De los 688 miARN que superaron los criterios de filtración preprocesamiento, el análisis estadístico inicial del conjunto de entrenamiento identificó 27 miARN que muestran diferencias fuertes (al menos 50% de cambio) y altamente significativas (valores P corregidos por Bonferroni <0,001 de la prueba de la t) entre CTCL y enfermedades cutáneas benignas y piel normal (figura 1). Por lo tanto, los niveles de expresión de un gran número de miARN difieren considerablemente entre pacientes con CTCL y pacientes con BDN. Se obtuvieron resultados esencialmente similares usando agrupamiento jerárquico no supervisado basándose en los 209 miARN más variables (no se muestran los datos).

**Tabla 1.** Características clínicas de pacientes en el estudio. Las indicaciones se estratifican de acuerdo con edad, género, y el lote de producción de micromatrices. Los valores P se calcularon usando la prueba exacta de Fisher en sumas entre sub-indicaciones (las columnas □). MF, micosis fungoide; SS, síndrome de Sezary; CALCL, linfoma de células grandes anaplásico cutáneo; NOS, linfoma cutáneo de células T - no especificado de otro modo; AD, dermatitis atópica; ND, dermatosis no especificada; PP, piel con lesiones de pacientes de psoriasis; PN, piel sin lesiones de pacientes de psoriasis; NN, piel normal de controles sanos.

ES 2 610 245 T3

	Linfoma cutáneo (n=63)					Enfermedad cutánea benigna o piel normal (n=85)						Valor P
	MF (n=39)	SS (n=7)	CALCL (n=8)	NOS (n=9)	Σ	AD (n=20)	ND (n=4)	PP (n=42)	PN (n=17)	NN (n=2)	Σ	
<i>Edad (años) *</i>												<0,001
<30	0	0	1	0	1	19	0	4	4	2	29	
30-44	5	0	0	0	5	1	0	6	3	0	10	
45-59	9	1	1	2	13	0	1	19	7	0	27	
60-74	14	5	2	2	24	0	3	12	2	0	17	
≥75	10	0	2	5	17	0	0	1	1	0	2	
<i>Género*</i>												1,00
Masculino	23	7	5	5	40	8	1	30	16	2	57	
Femenino	15	0	1	4	20	12	3	12	1	0	28	
<i>Lote de micromatriz</i>												1,00
1	8	2	1	2	13	4	1	8	3	1	17	
2	7	2	2	1	12	4	1	8	3	1	17	
3	7	1	2	2	12	4	1	8	3	0	16	
4	9	1	2	2	14	4	0	9	4	0	17	
5	8	1	1	2	12	4	1	9	4	0	18	

\* El género y la edad de 2 muestras de CALCL y una muestra de MF se desconocen

**Ejemplo 2 Identificación de una signatura de miARN específica de CTCL.**

Para descubrir una signatura específica de CTCL, se analizó el conjunto de entrenamiento con un algoritmo del centroide reducido más cercano (Tibshirani, 2002). Se descubrió que los 3 miARN más superiores inducidos (miR-5 326, miR-663b, miR-711) y los 2 más reprimidos (miR-203, miR-205) entre los 27 miARN altamente significativos en el análisis de matriz eran el conjunto óptimo de miARN para clasificación después de reducción de los centroides.

La significación de las diferencias en los niveles de expresión se evaluó mediante una prueba de la *t* para datos no emparejados bilateral. La predicción de clases se realizó usando clasificación mediante centroide reducido más cercano (Tibshirani, 2002). En resumen, un centroide estandarizado se computa para cada clase como la expresión promedio de cada microARN en cada clase dividido por la desviación estándar dentro de la clase para ese microARN. El perfil de expresión de microARN de una nueva muestra se compara a continuación con cada uno de estos centroides de clase, y la clase, cuyo centroide es el más cercano en distancia Euclídea, es la clase predicha para esa nueva muestra. El algoritmo se entrena reduciendo centroides de clase hacia el centroide global para todas las clases mediante una cantidad umbral que minimiza el error de clasificación errónea según lo determinado a través de validación cruzada de 10 iteraciones en el conjunto de entrenamiento.

Los cinco miARN tenían valores P corregidos por Bonferroni  $< 10^{-8}$  mediante la prueba de la *t*. Las muestras en el conjunto de entrenamiento podían clasificarse con el 93% de precisión (el 84% de sensibilidad y el 100% de especificidad,  $P < 0,001$  mediante la prueba exacta de Fisher, (figura: 2). Para evaluar el rendimiento de los cinco miARN en la clasificación de muestras desconocidas, se usó el clasificador ya entrenado en las 59 muestras del conjunto de ensayo, que se clasificaron con el 97% de precisión de clasificación (el 92% de sensibilidad y el 100% de especificidad,  $P < 0,001$  mediante la prueba exacta de Fisher) (figura 2C y 2D). La figura 3A muestra la expresión del miARN individual en el clasificador. Para cada uno de los cinco miARN, los valores de expresión de log2 normalizados se agrupan de acuerdo con el tipo de paciente (CTCL y BDN, respectivamente) (figura 3A).

A continuación, se evaluó la robustez del clasificador mediante validación cruzada de diez iteraciones, seleccionando cada vez diferentes lotes como conjunto de entrenamiento y de ensayo (pero manteniendo la relación 3/5 a 2/5). El enfoque anterior identificaba miR-203, miR-663b, miR-205 y miR-711 en casi todos los casos (tabla 2). Un miARN, miR-326, se seleccionó solamente en 2 de las 10 divisiones. De forma importante, sin importar qué división se seleccionó, la precisión de clasificación en el conjunto de ensayo estaba considerablemente por encima del 90% (93,1% de promedio con un intervalo de confianza del 99% entre el 90,5% y el 95,6%) (tabla 2). **Tabla 2.** Evaluación de la robustez de clasificación. Los cinco lotes de producción de micromatrices pueden dividirse en 3/5 conjuntos de entrenamiento y 2/5 de ensayo de 10 maneras diferentes. Para cada división, se seleccionaron miARN y se entrenó un clasificador. El clasificador descrito en este estudio corresponde al entrenado en la ronda dos.

Ronda	Lotes seleccionados para el conjunto de ensayo	Ensayo n (CTCL)	Ensayo n (BDN)	Lotes seleccionados para el conjunto de ensayo	n (CTCL)	n (BDN)	Precisión (entrenar)	Precisión (ensayo)	miARN en el clasificador
1	1, 2	25	34	3, 4, 5	38	51	0,94	0,95	203, 205, 299-5p, 663b, 711, 718
2	1, 3	25	33	2, 4, 5	38	52	0,93	0,97	203, 205, 326, 663b, 711
3	1, 4	27	34	2, 3, 5	36	51	0,95	0,89	203, 326, 663b, 718, 1252, 1249
4	1, 5	25	35	2, 3, 4	38	50	0,95	0,92	203, 205, 663b, 711, 718, 1252
5	2, 3	24	33	1, 4, 5	39	52	0,91	0,98	203, 205, 299-5p, 663b, 711
6	2, 4	26	34	1, 3, 5	37	51	0,95	0,92	34b, 203, 663b,



El área bajo la curva característica del operador receptor (ROC, figura 4C) era 0,989 con intervalo de confianza al 95% entre 0,9725 y 0,9996 (según se calculó a partir de 10000 elementos repetitivos de remuestreo *bootstrap* estratificados, Carpenter y Bithell, 2000). La significación de este resultado se estimó mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon como  $P < 2 \times 10^{-16}$ .

Se seleccionaron umbrales inspeccionando la distribución de puntuaciones de muestra (figura 4A+B) y la curva ROC (figura 4C), y se introdujo una región de baja confianza alrededor del umbral (figura 4A+B). Dado que la expresión de miR-203 y 205 disminuyó en CTCL (figura 4D) y la expresión de miR-155 se incrementaba en CTCL (figura 4D), la puntuación S era más pequeña en CTCL en comparación con trastornos cutáneos benignos (figura 4A+B). En 103 muestras, este clasificador de miARN "mínimo" basado en qRT-PCR (miR-155, miR-203 y miR-205) distinguía pacientes con CTCL de enfermedades cutáneas benignas con un 95% de precisión de clasificación ( $P < 0,001$ , figura 4B) y elevada sensibilidad/especificidad tal como se ilustra mediante el gráfico ROC en la figura 4C (el punto indica el 91% de sensibilidad al 97% de especificidad). De forma importante, los pacientes de MF se clasificaron como malignos independientemente de la fase de la enfermedad (figura 5). Cabe mencionar que las signaturas se diferencian incluso entre fases tempranas de MF y controles benignos (BDN).

La sensibilidad y especificidad conseguidas por el clasificador de miARN de los inventores constituyen una mejora significativa en comparación con la práctica actual. Además, la curva ROC altamente significativa, con un área bajo la curva (AUC) muy cercana a 1, hace altamente plausible que estas precisiones de clasificación se extienda a nuevas muestras.

#### Ejemplo 4

#### 25 El procedimiento UniRT

En este ejemplo, se describe de forma resumida el procedimiento UniRT para amplificación y cuantificación de moléculas de ARN pequeñas no codificantes mediante el uso de tecnología de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR).

En resumen, véase la figura 6, el protocolo UniRT es un protocolo de dos etapas. En la ETAPA 1 a los miR presentes en una muestra se les añade en primer lugar una cola de poli-A usando una poli(A) polimerasa, que añade residuos de adenina al extremo 3' de moléculas de ARN. En segundo lugar, un cebador de extensión, que tiene una secuencia de nucleótidos de núcleo poli-T, un motivo degenerado VN en el extremo 3' y una cola en el extremo 5', se hibrida a los miR con cola de poli-A a través de hibridación con la secuencia VN-poli-T del cebador de extensión. Posteriormente, el cebador de extensión se extiende en una reacción de transcripción inversa usando el miR como plantilla. El producto de extensión primario resultante está compuesto por el cebador de extensión y el ADNc recién sintetizado, que es complementario a los miR en la muestra.

En la siguiente etapa, ETAPA 2, se lleva a cabo una PCR específica de miR. Un cebador directo específico de miR hibrida con el extremo 3' del ADNc recién sintetizado y la síntesis de la cadena superior se lleva a cabo extendiendo el cebador directo en una reacción de polimerización de ADN usando el producto de extensión primario como plantilla. Un cebador inverso específico de miR de una secuencia del extremo 3' específica de miR, un tramo de poli-T y una cola del extremo 5' se hibrida a continuación con la cadena superior y la cadena inferior se sintetiza mediante extensión del cebador directo.

Tanto en la ETAPA 1 como en la ETAPA 2 los LNA ayudan a garantizar una hibridación específica y eficiente de los cebadores sus dianas respectivas.

#### 50 Ejemplo 5

#### Identificación de microARN mediante el procedimiento UniRT

Los niveles de let-7b, miR-103, miR-155, miR-184, miR-191, miR-203, miR-205, miR-24, miR-299-5p, miR-326, miR-34b, miR-423-5p, miR-663b, miR-711 y miR-718 se cuantifican usando el procedimiento de qPCR UniRT (véase el ejemplo 4). En resumen,

En la ETAPA 1 del protocolo UniRT se usaron 10 ng de ARN total por 10  $\mu$ l de reacción de RT que tiene la composición:

Tampón de reacción (1x Tampón de reacción contiene; NaCl 167 mM, KCl 25 mM, Tris-HCl 50 mM, MoCl<sub>2</sub> 8 mM, DTT 3,33 mM, ATP 0,1 mM, dATP 0,1 mM, dCTP 0,1 mM, dGTP 0,1 mM y dTTP 0,1 mM)

5 0,5 µM de cebador de RT (L2TA3: 5'-ggtagtagttttttttttvnn (SEQ IDNO. 1)), o (v designa residuos de citosina, guanina y adenina, n designa residuos de citosina, guanina, adenina y timina).

100 unidades de transcriptasa inversa del virus de la leucemia de Moloney (M-MuLV) (New England Biolabs, Ipswich MA)

10

1 unidad de Poli (A) Polimerasa de E. coli (New England Biolabs, Ipswich MA)

Las reacciones de RT se realizaron por triplicado (tres reacciones de RT por muestra).

15

La reacción de RT se incubó a 42°C durante 1 hora, 95°C durante 5 minutos.

A continuación, la reacción RT se diluyó 50x en agua antes del análisis qPCR - ETAPA 2.

En la ETAPA 2 del protocolo UniRT 1 µl de la reacción RT diluida se mezcló con los conjuntos de cebador de PCR de la tabla (la concentración final de cada cebador es 0,3 µM) para cada miR y mezcla Fast start SYBR Green Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el protocolo de los proveedores.

Todas las qPCR se realizaron de forma individual (una reacción de qPCR por reacción RT) en 10 µl de volumen de reacción. Las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 384 pocillos en un Lightcycler 480 II de Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Todos los datos de PCR en tiempo real se analizaron usando el método del Cp (punto de cruce) calculando las relaciones de expresión relativas de los miR diana específicos como la diferencia del punto de cruce (ΔCp) de los miR específicos con respecto a uno o varios genes de referencia (Bustin, 2004; Vandesompele, 2002).

30

Los valores de Cp se calcularon usando la publicación de software Lightcycler 480 1.5.0, versión 1.5.0.39 acompañando al instrumento Lightcycler 480 II.

**Tabla 3.** Secuencias de microARN y cebador

	Versión de miRBase	Secuencia de miR (5'->3')	Cebadores F_secuencia del cebador (5'->3')	Cebadores R_secuencia del cebador (5'->3')
let-7b	12	tgagtagtagttgtgtggt (SEQ ID NO.2)	catgagtagtaggtg (SEQ ID NO. 17)	ggtagtagtttttttttaaccac (SEQ ID NO. 32)
miR-103	12	agcagcattgtacagggtatga (SEQ ID NO. 3)	agcagcattgtacagg (SEQ ID NO. 18)	gtactagttttttttttcatagc (SEQ ID NO. 33)
miR-155	12	ttaatgctaactcgtgataggggt (SEQ ID NO. 4)	gactaatgctaactcgtgat (SEQ ID NO. 19)	gtactagtttttttttttacccta (SEQ ID NO. 34)
miR-184	12	tggacggagaactgataagggt (SEQ ID NO. 5)	tggacggagaactgat (SEQ ID NO. 20)	gtactagtttttttttttaccct (SEQ ID NO. 35)
miR-191	12	caacggaatcccaaaagcagctg (SEQ ID NO. 6)	caacggaatcccaaaagc (SEQ ID NO. 21)	gtactagtttttttttttcagc (SEQ ID NO. 36)
miR-203	12	gtgaaatgtttaggaccactag (SEQ ID NO. 7)	gtgaaatgtttaggacca (SEQ ID NO. 22)	tgacacggaggtagtagtttttttttct ag (SEQ ID NO. 37)
miR-205	12	tccttcattccaccggagtctg (SEQ ID NO. 8)	tccttcattccaccgga (SEQ ID NO. 23)	gtactagtttttttttttcagact (SEQ ID NO. 38)
miR-24	12	tggctcagttcagcaggaacag (SEQ ID NO. 9)	tggctcagttcagca (SEQ ID NO. 24)	tgacacggaggtagtagtttttttttct gttc (SEQ ID NO. 39)
miR-299-5p	12	tggttaccgtcccacatacat (SEQ ID NO. 10)	tggttaccgtcccacat (SEQ ID NO. 25)	gaggtactagtttttttttttatgta (SEQ ID NO. 40)
miR-326	12	cctctgggcccttctccag (SEQ ID NO. 11)	cctctgggcccttct (SEQ ID NO. 26)	gtactagtttttttttttctgga (SEQ ID NO. 41)

miR-34b	12	caatcactaactccactgcat (SEQ ID NO. 12)	caatcactaactccactg (SEQ ID NO. 27)	ggtagtagttttttttttatggc (SEQ ID NO. 42)
miR-423-5p	12	tgaggggcagagagcgagactt (SEQ ID NO. 13)	catgggcagagagc (SEQ ID NO. 28)	aggtagtagtttttttttaagtc (SEQ ID NO. 43)
miR-663b	12	ggtggcccggcgtgcctgagg (SEQ ID NO. 14)	ccggccgtgcct (SEQ ID NO. 29)	gtactagtttttttttctca (SEQ ID NO. 44)
miR-711	14	gggaccaggagagacgtaag (SEQ ID NO. 15)	agggaccaggagaga (SEQ ID NO. 30)	ggtagtagtttttttttcttacg (SEQ ID NO. 45)
miR-718	14	cttccgccccggcggcgtcg (SEQ ID NO. 16)	tatcttccgccccggc (SEQ ID NO. 31)	ttttttcgagcg (SEQ ID NO. 46)

A las secuencias del cebador se les añade LNA (del 0% al 13,3% de los nucleótidos) en combinación con nucleótidos de origen natural. Excepto para miR-711 y miR-718, todos los miR son secuencias de miR humano que se encuentran en la publicación de la base de datos de registro de miR 12.0 alojada por el instituto Sanger, Reino Unido (miR 12\_0). miR-711 y miR-718 no fueron publicados hasta la publicación de la base de datos de registro 14.0.

**Ejemplo 6**

**Ensayo de qRT-PCR TaqMan de ABI.**

5 Se obtuvieron muestras de biopsia cutánea de pacientes con linfoma cutáneo de células T, pacientes con enfermedades cutáneas benignas que incluyen psoriasis y dermatitis atópica, y sujetos sanos. Los bloques de FFPE se seccionaron en entorno libre de ARNasa. Ocho secciones de tejido de 10 µm se colocaron en cada uno de dos tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (16 secciones en total) y el ARN total se extrajo usando el kit de aislamiento de ácido nucleico total RecoverAll (Applied Biosystems/Ambion, EE. UU.) de acuerdo con las directrices del fabricante. De cada muestra, 15 ng de ARN total se transcribieron de forma inversa a ADNc usando el kit de transcripción inversa de microARN TaqMan con cebadores apropiados (Applied Biosystems, EE. UU.) siguiendo las directrices del fabricante. Triplicados de 5 ng de ADNc por reacción se mezclaron, cada uno, con la mezcla maestra de PCR universal TaqMan y los cebadores y la sonda relevantes (Applied Biosystems, EE. UU.) y se sometieron a una serie en el instrumento de 384 pocillos ABI Prism 7900HT de Applied Biosystems en configuración estándar. El umbral de ciclo (Ct, el ciclo de PCR al que señal de la sonda alcanza un valor umbral por encima del fondo fluorescente) se determinó para cada pocillo.

20 Mediciones de Ct de tres pocillos de elementos repetitivos técnicos para cada pocillo se combinaron para producir una señal tomando la media de pocillos fiables. Para permitir la identificación de un factor de normalización expresado de forma estable, se incluyeron cinco referencias de ARN usadas habitualmente (RNU6A, RNU6B, RNU14B, RNU48 y SNORD12), además de los microARN de interés, y se clasificaron de acuerdo con su elemento estabilidad-medida entre todas las muestras (Vandesompele y col., 2002).

25 Los dos ARN pequeños RNU6B y SNORD12 se identificaron como las referencias expresadas de forma más estable entre muestras y su Ct promedio se usó como factor de normalización cuando se calculaba ΔCt (Vandesompele y col., 2002). Las muestras se seleccionaron basándose en alto contenido de ARN y cubrían muestras de conjunto tanto de entrenamiento como de ensayo. La expresión diferencial se confirmó claramente para miR-203, miR-205 y miR-326 (tabla 4).

30 **Tabla 4. Expresiones y significación para los 5 microARN en el clasificador.** Se muestran los resultados para medición tanto de micromatriz y qRT-PCR. La columna de prueba de rangos Wilcoxon describe valores P de una prueba de Wilcoxon realizada en una matriz de datos no normalizada donde las intensidades medidas en cada matriz se sustituyen por su rango cuando se comparan con todas las intensidades en esa matriz. La significación a partir de esta prueba indica, por lo tanto, que la intensidad para ese microARN cambia claramente de rango entre las condiciones comparadas (que están por ejemplo entre las intensidades más bajas en cada matriz en un grupo de muestras, y que tienen por lo tanto un rango consistentemente bajo, pero entre las intensidades más bajas en cada matriz en otro grupo de muestras, y que tienen por lo tanto un rango consistentemente elevado en las tres matrices).

ES 2 610 245 T3

microARN	matriz		qPCR						
	expresión log2 promedio de CTCL	expresión log2 promedio de BDN	Cambio múltiplo de log2	<i>P</i> (prueba de la t)	<i>P</i> (prueba de rangos Wilcoxon)	Expresión promedio de CTCL (- $\Delta$ Ct)	Expresión promedio de BDN (- $\Delta$ Ct)	Cambio múltiplo de log2 ( $\Delta\Delta$ Ct)	<i>P</i> (prueba de la t)
miR-203	6,11	6,88	-0,77	2,50E-23	1,80E-20	5,2	8	-2,8	4,00E-09
miR-663b	5,8	5,11	0,69	5,30E-17	3,70E-14	10,9	9,4	1,5	0,002
miR-326	6,2	5,6	0,6	1,10E-15	8,10E-13	1,4	-1	2,4	4,60E-08
miR-711	6,13	5,43	0,7	2,00E-15	1,40E-12	-6,3	-4,5	-1,8	0,02
miR-205	6,25	7,34	-1,1	5,00E-13	3,50E-10	6,2	9,4	-3,2	3,30E-10

Para miR-663b, el cambio de expresión promedio en la misma dirección (incrementado en CTCL) para mediciones tanto de micromatriz como de qRT-PCR, pero el valor P es solamente 0,002 para las mediciones de qRT-PCR, lo que es una significación mucho menor que para miR-203, miR-205 y miR-326 (incluso cuando se tiene en cuenta el menor número de muestras ensayadas). El gráfico de amplificación de fluorescencia para miR-663b mostraba un comportamiento bifásico con dos mesetas, lo que indica que los cebadores y la sonda TaqMan no se comportan bien. De forma importante miR-711 no consiguió significación en las mediciones de qRT-PCR.

## BIBLIOGRAFÍA

- 10 Ambros (2003) RNA 9, 277-279
- Ballabio E, Mitchell T, Kester MS van, y col. Microna expression in sezary syndrome: identification, function, and diagnostic potential. Blood. 2010; 116: 1105-13.
- 15 Burg G, Kempf W, Cozzio A, y col. Who/eortc classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. Journal of cutaneous pathology. 2005; 32: 647-74.
- Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Journal of biomolecular techniques. 2004; 15: 155-66.
- 20 Chen J, Odenike O, Rowley JD. Leukaemogenesis: more than mutant genes. Nature reviews. Cancer. 2010; 10: 23-36.
- Cleveland WS, Grosse E, Shyu MJ. Local regression models. Statistical Models in S. 1992; 309-376:
- 25 Dereure O, Levi E, Vonderheid EC, Kadin ME. Infrequent fas mutations but no bax or p53 mutations in early mycosis fungoides: a possible mechanism for the accumulation of malignant t lymphocytes in the skin. The Journal of investigative dermatology. 2002; 118: 949-56.
- 30 Doom R van, Kester MS van, Dijkman R, y col. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with sezary syndrome. Blood. 2009; 113: 127-36.
- Duda, Peter E. Hart, David G. Stork, "Pattern Classification". Wiley Interscience, 2ª edición, 2001, paginas 36-39
- 35 Fits L van der, Kester MS van, Qin Y, y col. Microma-21 expression in cd4+ t cells is regulated by stat3 and is pathologically involved in sézary syndrome. The Journal of investigative dermatology. 2011; 131: 762-8.
- Foss FM, Zinzani PL, Vose JM, y col. Peripheral t-cell lymphoma. Blood. 2011;
- 40 Garzon R, Calin G a, Croce CM. Micronas in cancer. Annual review of medicine. 2009; 60: 167-79.
- Girardi M, Heald PW, Wilson LD. The pathogenesis of mycosis fungoides. The New England journal of medicine. 2004; 350: 1978-88.
- 45 Gjerdrum LM, Woetmann a, Odum N, y col. Foxp3+ regulatory t cells in cutaneous t-cell lymphomas: association with disease stage and survival. Leukemia 2007; 21: 25: 12-8.
- Holst LM, Kaczkowski B, Gniadecki R. Reproducible pattern of microna in normal human skin. Experimental dermatology. 2010; 19: e201-5.
- 50 James Carpenter and John Bithell (2000) "Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians". Statistics in Medicine 19, 1141-1164.
- 55 Kester MS van, Ballabio E, Benner MF, y col. Mirna expression profiling of mycosis fungoides. Molecular oncology. 2011; 5, 273-80.
- Krejsgaard T, Vetter-Kauczok CS, Woetmann A, y col. Ectopic expression of B-lymphoid kinase in cutaneous T-cell lymphoma. Blood. 2009; 113: 5896-904.

Lee BN, Duvic M, Tang CK, y col. Dysregulated synthesis of intracellular type 1 and type 2 cytokines by t cells of patients with cutaneous t-cell lymphoma. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1999; 6: 79-84.

5 Narducci MG, Arcelli D, Picchio MC, y col. MicroRNA profiling reveals that mir-21, mir486 and mir-214 are upregulated and involved in cell survival in sézary syndrome. *Cell death & disease*. 2011; 2: e151.

10 Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, y col. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and sezary syndrome: a proposal of the international society for cutaneous lymphomas (iscl) and the cutaneous lymphoma task force of the european organization of research and treatment of ca. *Blood*. 2007; 110: 1713-22.

Ritchie ME, Silver J, Oshlack A, y col. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics*. 2007; 23: 2700-7.

15 Rosen ST, Querfeld C. Primary cutaneous t-cell lymphomas. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 2006; 323-30, 513.

Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, y col. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature biotechnology*. 2008; 26: 462-9.

20 Tibshirani RJ, Efron B. Pre-validation and inference in microarrays. *Statistical applications in genetics and molecular biology*. 2002; 1: Artículo 1.

25 Trautinger F, Knobler R, Willemze R, y col. Eortc consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/sézary syndrome. *European journal of cancer*. 2006; 42: 1014-30.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, y col. Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002; 3: RESEARCH0034.

30 Willemze R, Jaffe ES, Burg G, y col. Who-eortc classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005; 105: 3768-85:

WO 2010/085966

LISTADO DE SECUENCIAS

35

<110> RALFKIR, Ulrik HAGEDORN, Peter AHLER, Charlotte Busch GEISLER, Carsten WOETMANN, Anders SKOV, Lone ODUM, Niels Feentved RALFKIER, Elisabeth

40

<120> PERFILADO DE MICROARN DE DIAGNÓSTICO EN LINFOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS T (CTCL)

<130> 3893-0312PWO1

45

<150> US 61/508,838

<151> 18-07-2011

<150> US 61/508.231

<151> 15-07-2011

50

<160> 49

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

55

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador RT sintético: L2TA3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25) .. (26)  
 5 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <400> 1  
  
 10 ggtactagtt tttttttt ttvnn 26  
  
 <210> 2  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 15  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(22)  
 <223> secuencia de miR: let-7b  
 20  
  
 <400> 2  
  
 tgaggtagta ggtgtgtgg tt 22  
 25  
  
 <210> 3  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 30  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(23)  
 <223> secuencia de miR: miR-103  
 35  
  
 <400> 3  
  
 agcagcattg tacagggcta tga 23  
 40  
  
 <210> 4  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(23)  
 <223> secuencia de miR: miR-155  
 50  
  
 <400> 4  
  
 ttaatgctaa tcgtgatagg ggt 23  
 55  
  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature

<222> (1)..(22)  
 <223> secuencia de miR: miR-184  
  
 <400> 5  
 5           tggacggaga actgataagg gt           22  
  
 <210> 6  
 <211> 23  
 10          <212> ADN  
           <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15          <222> (1)..(23)  
           <223> secuencia de miR: miR-191  
  
 <400> 6  
 20          caacggaatc ccaaagcag ctg       23  
  
 <210> 7  
 <211> 22  
 25          <212> ADN  
           <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30          <222> (1)..(22)  
           <223> secuencia de miR: miR-203  
  
 <400> 7  
 35          gtgaaatggt taggaccact ag       22  
  
 <210> 8  
 <211> 22  
 40          <212> ADN  
           <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 45          <222> (1)..(22)  
           <223> secuencia de miR: miR-205  
  
 <400> 8  
 50          tccttcattc caccggagtc tg       22  
  
 <210> 9  
 <211> 22  
 55          <212> ADN  
           <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(22)  
 <223> secuencia de miR: miR-24

# ES 2 610 245 T3

<400> 9  
tggtcagtt cagcaggaac ag 22  
5 <210> 10  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(22)  
<223> secuencia de miR: miR-299-5p  
15 <400> 10  
tggttaccg tcccacatac at 22  
<210> 11  
<211> 20  
20 <212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> misc\_feature  
25 <222> (1)..(20)  
<223> secuencia de miR: miR-326  
<400> 11  
30 cctctgggcc ctcctccag 20  
<210> 12  
<211> 22  
<212> ADN  
35 <213> Homo sapiens  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(22)  
40 <223> secuencia de miR: miR-34b  
<400> 12  
45 caatcactaa ctccactgcc at 22  
<210> 13  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
50 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(23)  
<223> secuencia de miR: miR-423-5p  
55 <400> 13  
tgaggggcag agagcgagac ttt 23

<210> 14  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(22)  
 <223> secuencia de miR: miR-663b  
 10  
 <400> 14  
 ggtggcccgg ccgtgcctga gg 22  
 15  
 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Secuencia de miR sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(22)  
 <223> secuencia de miR: miR-711  
 25  
 <400> 15  
 30  
 gggaccagg gagagacgta ag 22  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Secuencia de miR sintético  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(21)  
 <223> secuencia de miR: miR-718  
 45  
 <400> 16  
 cttccgccc gccggcgtc g 21  
 50  
 <210> 17  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador F sintético  
 55  
 <400> 17  
 catgagtag taggtg 17

5 <210> 18  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador F sintético  
  
 10 <400> 18  
  
 agcagcattg tacagg 16  
  
 15 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador F sintético  
 <400> 19  
  
 gacttaatgc taatcgtgat 20  
  
 25 <210> 20  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Cebador F sintético  
  
 <400> 20  
  
 35 tggacggaga actgat 16  
  
 <210> 21  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador F sintético  
  
 45 <400> 21  
  
 caacggaatc ccaaaagc 18  
  
 50 <210> 22  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 55 <223> Cebador F sintético  
  
 <400> 22  
  
 gtgaaatggt taggacca 18

# ES 2 610 245 T3

5 <210> 23  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador F sintético

10 <400> 23

tccttcattc caccgga 17

15 <210> 24  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador F sintético

20 <400> 24

25 tggctcagtt cagca 15

<210> 25  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Cebador F sintético

<400> 25

35 tggttaccg tcccacat 18

<210> 26  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador F sintético

45 <400> 26

cctctgggcc ctcct 16

50 <210> 27  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Cebador F sintético  
<400> 27

caatcactaa ctccactg 18

<210> 28  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador F sintético  
 10 <400> 28  
  
 catgggcaga gage 14  
  
 <210> 29  
 15 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Cebador F sintético  
 <400> 29  
  
 ccggccgtgc ct 12  
 25 <210> 30  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador F sintético  
 <400> 30  
  
 agggaccag ggaga 15  
 35 <210> 31  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador F sintético  
 <400> 31  
  
 45 tatctccgc cccgccg 17  
  
 <210> 32  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador R sintético  
 55 <400> 32  
  
 ggtactagtt tttttttt ttaaccac 29  
  
 <210> 33

# ES 2 610 245 T3

<211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cebador R sintético  
 <400> 33

10

gtactagtt tttttttt ttcatagc            28

<210> 34  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Cebador R sintético

20

<400> 34

gtactagtt tttttttt ttacccta            29

<210> 35  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Cebador R sintético

30

<400> 35

gtactagtt tttttttt ttaccct            27

35

<210> 36  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Cebador R sintético  
 <400> 36

45

gtactagtt tttttttt ttcagc            26

<210> 37  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Cebador R sintético

55

<400> 37

tgacacggag gtactagtt tttttttt tctag            36

<210> 38  
 <211> 28

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 5 <220>  
 <223> Cebador R sintético  
  
 <400> 38  
  
 10 gtactagtt tttttttt tcagact 28  
  
 <210> 39  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
  
 <220>  
 <223> Cebador R sintético  
  
 <400> 39  
 20  
 tgacacggag gtactagtt tttttttt tctgtc 37  
  
 <210> 40  
 <211> 30  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador R sintético  
 30  
 <400> 40  
  
 gaggtactag tttttttt ttttatgta 30  
 35  
 <210> 41  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador R sintético  
  
 <400> 41  
 45 gtactagtt tttttttt ttctgga 27  
  
 <210> 42  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador R sintético  
  
 <400> 42  
 55  
 ggtactagtt tttttttt tttatggc 28  
  
 <210> 43

ES 2 610 245 T3

<211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador R sintético  
 <400> 43  
 10 aggtactagt tttttttt tttaaagtc 29  
 <210> 44  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador R sintético  
 20 <400> 44  
 gtactagtt tttttttt ttctca 27  
 <210> 45  
 25 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Cebador R sintético  
 <400> 45  
 ggtactagtt tttttttt ttcttacg 29  
 35 <210> 46  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador R sintético  
 <400> 46  
 45 ttttttcg acgc 14  
 <210> 47  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cola de poliA sintética de microARN  
 55 <400> 47  
 aaaaaaaaaa 10  
 <210> 48

<211> 13  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador de extensión sintético

<220>  
<221> misc\_feature  
10 <222> (12)..(13)  
<223> n es a, c, g, o t

<400> 48

15 tttttttt vnn 13

<210> 49  
<211> 10  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> ADN sintético  
<400> 49

25 tttttttt 10

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para clasificar una muestra de células cutáneas de ensayo procedente de un individuo con una enfermedad cutánea inflamatoria como linfomas cutáneos, que comprende:
- 5 detectar los niveles de expresión de microARN al menos de uno de miR-155 y miR-326, y tanto miR-203 como miR-205,  
 calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo basándose en un conjunto de datos que comprenden los niveles de expresión de dichos microARN, y  
 10 clasificar la muestra de células de ensayo como linfomas cutáneos o no, basándose en el valor de la puntuación clínica.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde los niveles de microARN miR-155, miR-203 y miR-205 se detectan y se usan para calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde los niveles de microARN miR-326, miR-203 y miR-205 se detectan y se usan para calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, donde los niveles de microARN miR-155, miR-326, miR-203 y miR-205 se detectan y se usan para calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, donde los niveles de microARN miR-155, miR-326, miR-203, miR-205 y miR-663b se detectan y se usan para calcular una puntuación clínica (S) de la muestra de células de ensayo.
- 25 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el linfoma cutáneo es linfoma cutáneo de células T (CTCL).
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la puntuación clínica se calcula como una relación del nivel de expresión de miR-155 y los niveles de expresión promedio de miR-203 y miR-205.
- 30 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la puntuación clínica se calcula como una relación del nivel de expresión de miR-326 y los niveles de expresión promedio de miR-203 y miR-205.
- 35 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la puntuación clínica se calcula como una relación del nivel de expresión de miR-155 y miR-326 con respecto a los niveles de expresión promedio de miR-203 y miR-205.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los niveles de expresión de los microARN se determinan mediante Q-PCR.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 10, donde la puntuación clínica se calcula de la siguiente manera:
- 45 
$$S = X * C (miR-155) + Y * C (miR-205) + Z * C (miR-203)$$
- donde "C" es el valor de ciclo umbral (Ct) o el valor de punto de corte (Cp), y donde X, Y y Z son coeficientes determinados mediante regresión lineal, con la condición de que  $X + Y + Z = 0$ .
- 50 12. El procedimiento de la reivindicación 10, donde la puntuación clínica se calcula de la siguiente manera:
- $$S = X * C (miR-326) + Y * C (miR-205) + Z * C (miR-203)$$
- 55 donde "C" es el valor de ciclo umbral (Ct) o el valor de punto de corte (Cp), y donde X, Y y Z son coeficientes determinados mediante regresión lineal, con la condición de que  $X + Y + Z = 0$ .
13. El procedimiento de la reivindicación 10, donde la puntuación clínica se calcula de la siguiente manera:

$$S = C(miR-155) - C(miR-205)/2 - C(miR-203)/2$$

donde "C" es el valor de ciclo umbral (Ct) o el valor de punto de corte (Cp).

5

14. El procedimiento de la reivindicación 10, donde la puntuación clínica se calcula de la siguiente manera:

$$S = C(miR-326) - C(miR-205)/2 - C(miR-203)/2$$

10

donde "C" es el valor de ciclo umbral (Ct) o el valor de punto de corte (Cp).

15. El procedimiento de la reivindicación 10, donde la puntuación clínica se calcula de la siguiente manera:

15

$$S = C(miR-155) + C(miR-326) - C(miR-205) - C(miR-203)$$

donde "C" es el valor de ciclo umbral (Ct) o el valor de punto de corte (Cp).

20 16. El procedimiento de la reivindicación 10, donde la puntuación clínica se calcula de la siguiente manera:

$$S = C(miR-155)/3 + C(miR-326)/3 + C(miR-663b)/3 - C(miR-205)/2 - C(miR-203)/2$$

25 donde "C" es el valor de ciclo umbral (Ct) o el valor de punto de corte (Cp).

17. El procedimiento de la reivindicación 13, donde "C" es el valor de punto de corte (Cp) y donde, cuando la puntuación clínica "S" es menor de aproximadamente 6,5, en particular menor de 6,0, el ensayo indica que la muestra de células cutáneas de ensayo es linfoma cutáneo de células T, y donde, cuando la puntuación clínica "S" es mayor de aproximadamente 6,5, en particular mayor de aproximadamente 7,0, el ensayo indica que la muestra de células cutáneas de ensayo es benigna.

30

18. El procedimiento de la reivindicación 10, donde la puntuación clínica se calcula de la siguiente manera:

35

$$S = X*C(miR-155) + Y*C(miR-326) + Z*C(miR-663b) + W*C(miR-203) + Q*C(miR-205),$$

donde "C" es el valor de ciclo umbral (Ct) o el valor de punto de corte (Cp), y donde X, Y, Z, W y Q son coeficientes determinados mediante regresión lineal, con la condición de que  $X + Y + Z + W + Q = 0$ .

40

19. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, donde el procedimiento de Q-PCR es qRT-PCR.

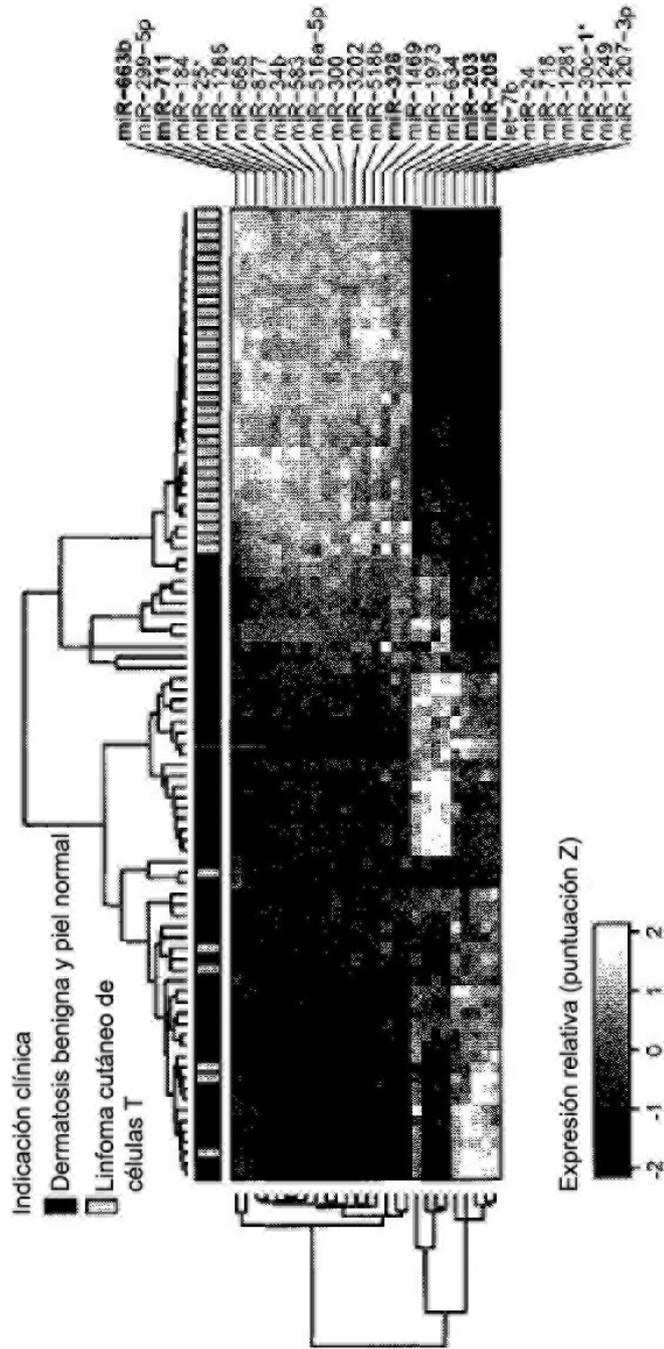
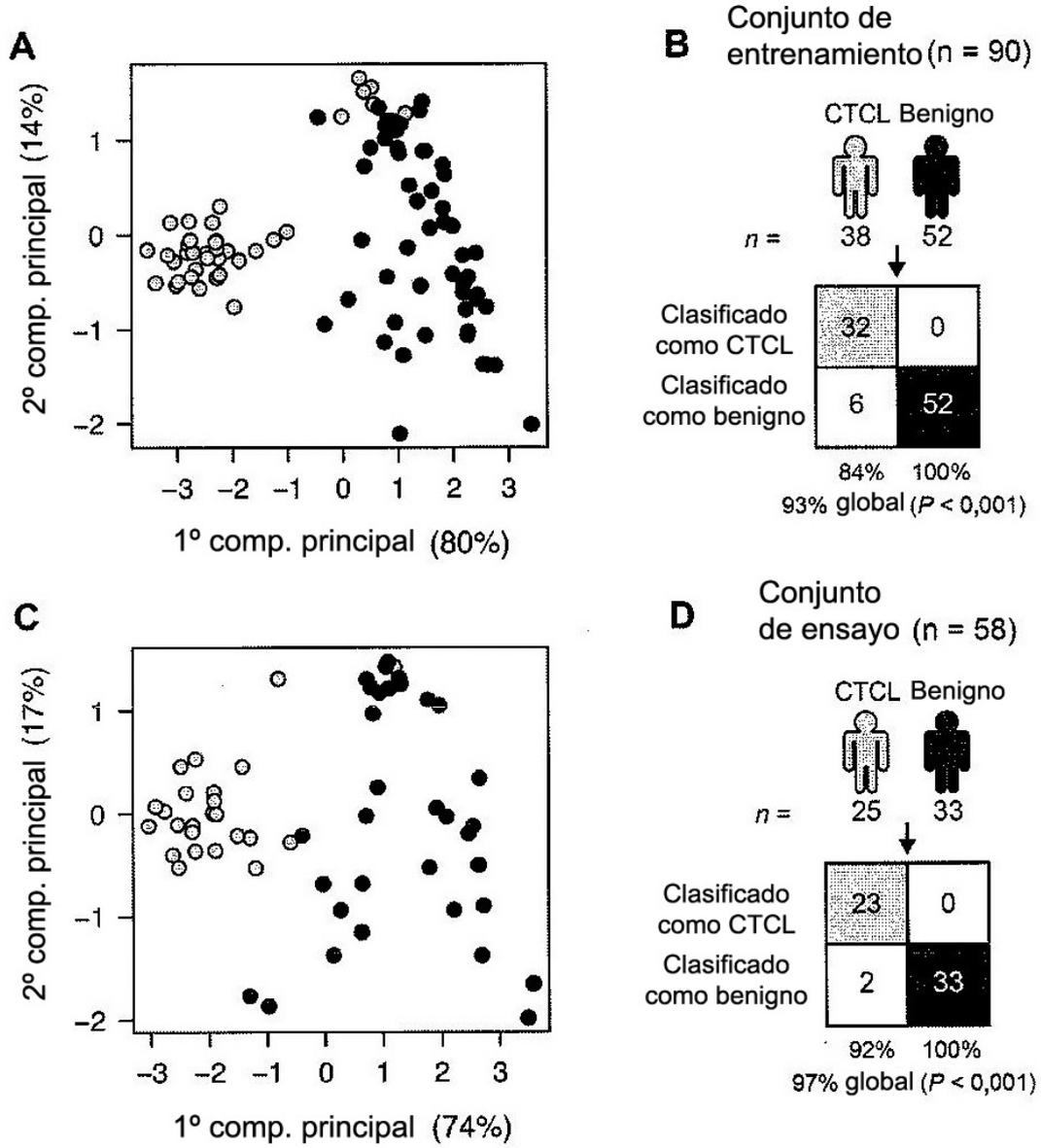
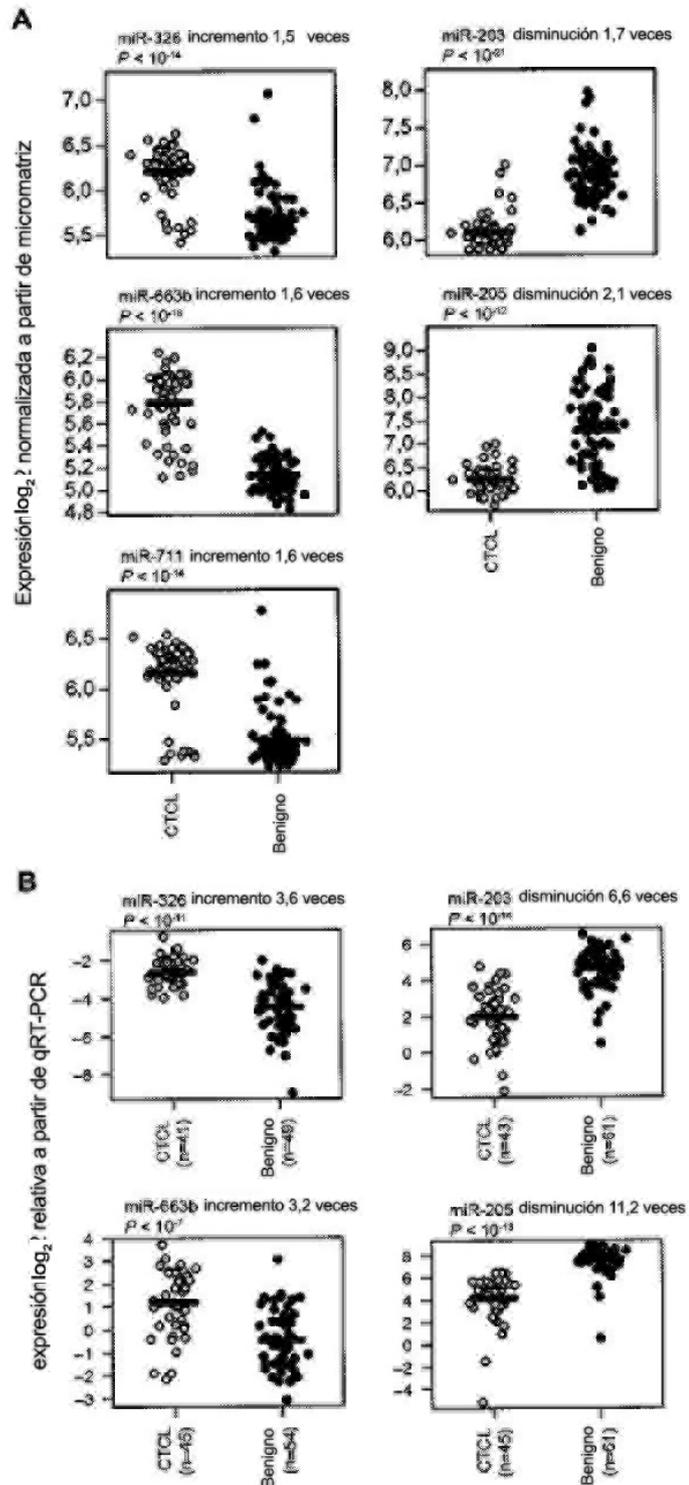


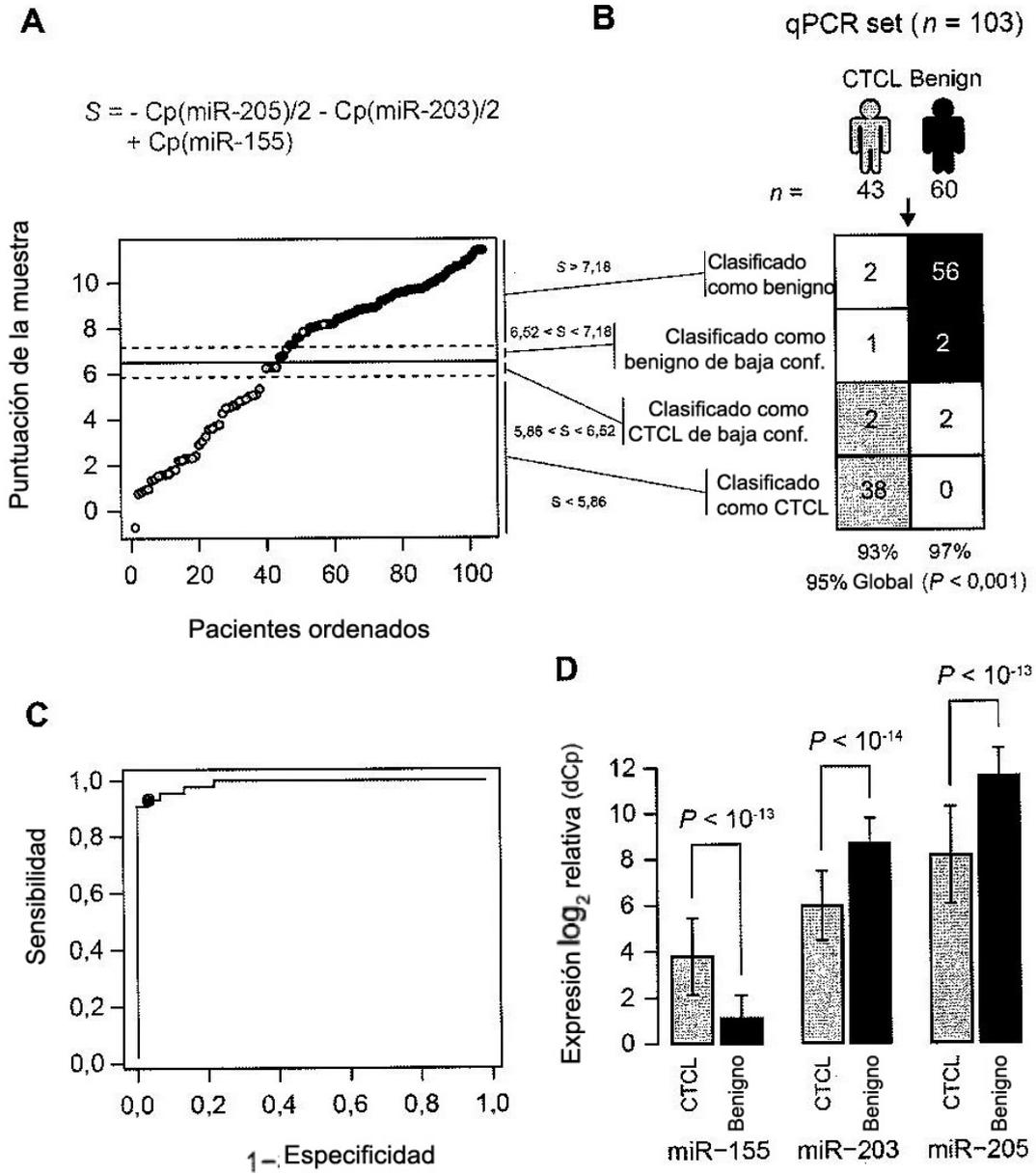
Fig. 1



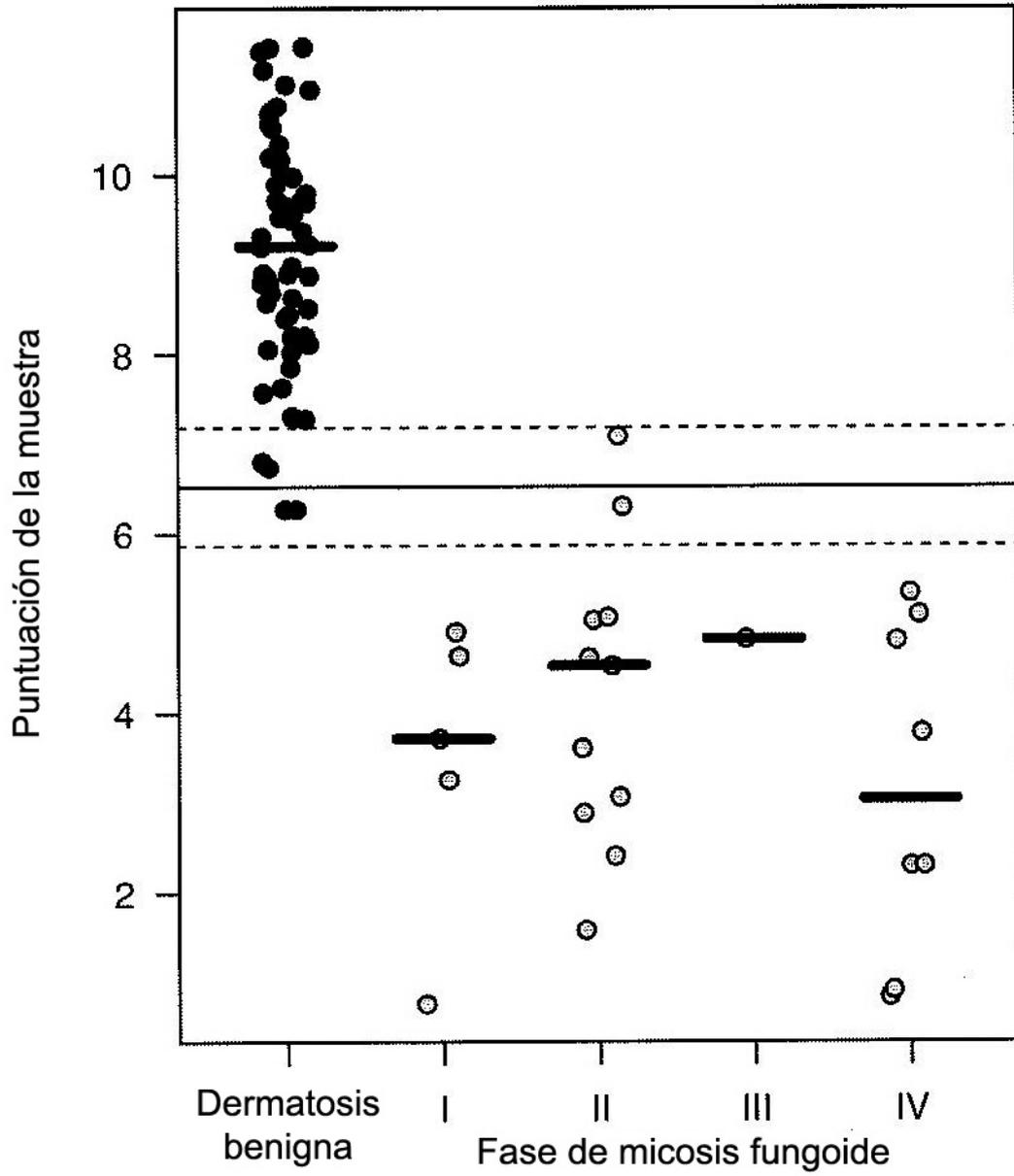
**Fig. 2**



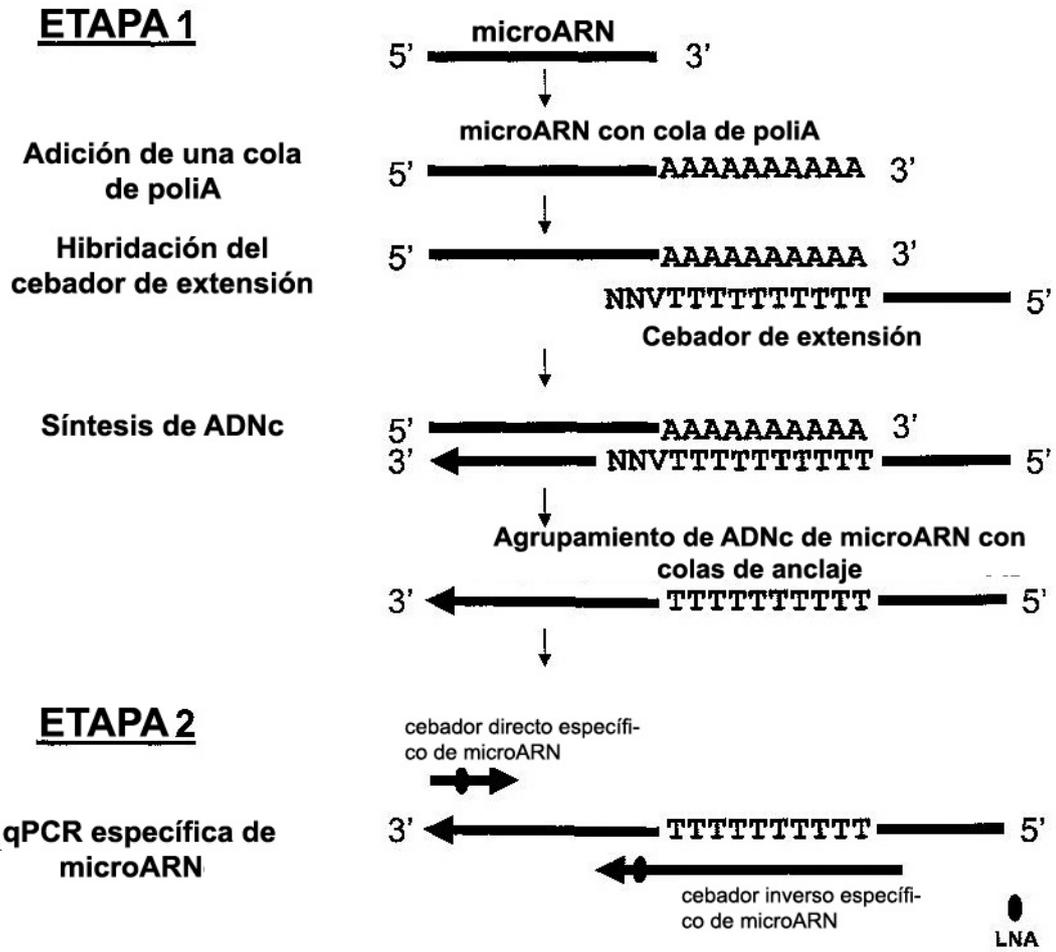
**Fig. 3**



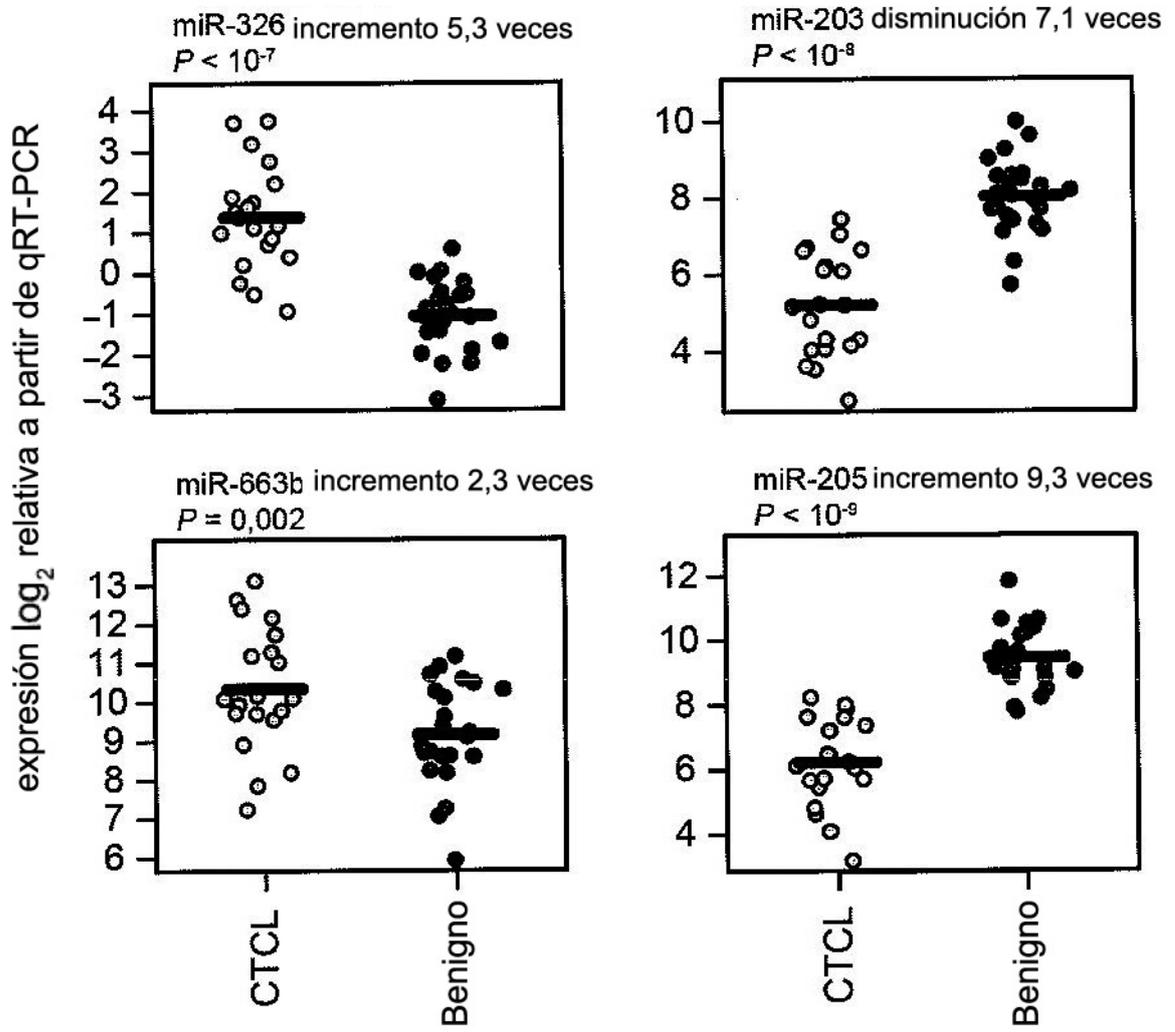
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**