

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 602**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2012** **PCT/US2012/034098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012** **WO12145409**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012** **E 12774179 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** **EP 2699666**

54 Título: **Prueba de detección universal (PDU) basada en miRNA**

30 Prioridad:

18.04.2011 US 201161476591 P

25.04.2011 US 201161478766 P

12.10.2011 US 201161546431 P

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

22.08.2017

73 Titular/es:

DIAMIR, LLC (100.0%)

3 Orchid Court

Princeton, NJ 08540, US

72 Inventor/es:

SHEINERMAN, KIRA S.;

TSIVINSKY, VLADIMIR y

UMANSKY, SAMUIL R.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 630 602 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

Prueba de detección universal (PDU) basada en miRNA

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención describe métodos para la detección no invasiva o mínimamente invasiva de cambios patológicos en sistemas de órganos, determinados órganos, tejidos y/o células con la cuantificación, en los líquidos corporales, de miRNA abundantes en un sistema de órganos, órgano, tejido, o tipo de célula.

Antecedentes de la invención

- 10 Está bien aceptado que el tratamiento de cualquier enfermedad es más fácil y más eficaz si la enfermedad subyacente se diagnostica lo antes posible. Para algunas enfermedades, el diagnóstico precoz (preferiblemente antes de que aparezcan los síntomas clínicos claros) es críticamente importante debido a la transición de la enfermedad hacia un estadio más avanzado, a veces irreversible. Por ejemplo, uno de los principales problemas para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades neurodegenerativas es que su manifestación y su diagnóstico clínico son tardíos debido a los altos potenciales compensatorios del cerebro. Como resultado, estas enfermedades normalmente se diagnostican cuando muchas
- 15 neuronas ya están muertas y, en la actualidad, la mejor situación del caso es que se impida el empeoramiento de la enfermedad, pero no una verdadera recuperación. El cáncer es otro ejemplo, ya que el tratamiento de la etapa metastásica de la enfermedad es mucho más problemática que el tratamiento del tumor primario. Hay muchas otras enfermedades de esta clase, pero, de nuevo, el tratamiento de cualquier enfermedad es más eficaz si se realiza un diagnóstico precoz.

- 20 Hay varios tipos básicos de pruebas clínicas: (i) las pruebas genéticas que ayudan a predecir la predisposición a una enfermedad concreta; (ii) las pruebas de detección, que se aplican a una gran población para la detección precoz de una enfermedad, preferiblemente antes de su manifestación clínica; (iii) las pruebas diagnósticas, que se aplican cuando una persona tiene síntomas clínicos de una enfermedad o cuando se ha detectado la enfermedad mediante una prueba de detección; (iv) las pruebas moleculares predictivas que deberían predecir el desenlace de la
- 25 enfermedad y la sensibilidad al fármaco.

- Las pruebas de detección son lo más importante para la detección precoz de una enfermedad. Esto es verdad no sólo para las enfermedades espontáneas, sino también para las enfermedades de origen genético, para las cuales se puede predecir una alta probabilidad de contraer una enfermedad mediante las pruebas genéticas. Idealmente, todo el mundo se debería someter a un cribado regular para todas las enfermedades potencialmente mortales y
- 30 muchas otras. Se ha intentado muchas veces desarrollar pruebas para la detección precoz de diferentes enfermedades y en la actualidad se realizan diversas pruebas de detección para grupos de riesgo específicos. Por ejemplo, se recomienda una colonoscopia periódica para las personas mayores de 50 años, se recomiendan citologías vaginales a las mujeres y pruebas del PSA a los hombres para la detección precoz del cáncer de cuello uterino y del cáncer de próstata, respectivamente. Una ventaja importante de estas pruebas es su especificidad de la enfermedad, pero al mismo tiempo es su desventaja más grave, porque cada prueba se dirige solo a una enfermedad concreta. Sin embargo, hay cientos de enfermedades humanas y es difícil imaginar que tales pruebas de detección específicas se desarrollen para todas estas enfermedades. Además, incluso aunque se hayan desarrollado pruebas específicas para la detección precoz de todas las enfermedades humanas, es muy poco probable que tales pruebas se utilizasen con propósitos de detección sistemática, en especial para las
- 35 enfermedades relativamente raras debido a factores económicos. Ya que las pruebas de detección para cada enfermedad concreta se dirigen a grandes poblaciones, su especificidad y valor predictivo positivo (VPP) son muy importantes. Por ejemplo, si una prueba de detección para una enfermedad relativamente frecuente (1:10.000) es sensible al 100% y específica al 99%, lo que es casi imposible de conseguir, y se criban 1 millón de personas, se detectarían correctamente 100 casos, pero aproximadamente 10.000 personas recibirían resultados positivos falsos.
- 40 Obviamente, tal resultado causaría un desasosiego emocional en estas personas y tendría una repercusión económica importante debido a las pruebas posteriores.

Compendio de la invención

- Tal y como se especifica en el apartado Antecedentes, más arriba, hay una gran necesidad en la técnica de nuevas pruebas de detección. De acuerdo con el paradigma actual para el desarrollo de pruebas de detección y su aplicación clínica, una de las principales características de tal prueba debe ser su gran especificidad de la enfermedad. Sin embargo, tal y como se mencionó más arriba, hay cientos de enfermedades y la detección sistemática de cada enfermedad concreta es virtualmente imposible. La presente invención propone un cambio de paradigma significativo: el desarrollo y la implantación de uno o un pequeño número de pruebas de detección universal (las PDU), que específicamente detectarían una enfermedad de cualquier sistema de órganos, órgano,
- 50 tejido y/o tipo de célula, sin que se diagnostique una enfermedad concreta. Tales PDU se deberían realizar periódicamente en cualquier sujeto dado en un estadio temprano, preferiblemente sin síntomas clínicos, y a continuación se podrán utilizar pruebas más específicas para un diagnóstico más específico. Las PDU, tal y como se describen en la presente memoria, mejorarían el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades, y reducirían
- 55

significativamente los costes médicos. De igual forma, las PDU, tal y como se describen en la presente memoria, harían que pruebas para las enfermedades raras fueran más dirigidas, ya que se aplicarían a poblaciones mucho más pequeñas seleccionadas previamente por la PDU y, por lo tanto, serán más prácticas desde el punto de vista económico.

- 5 Ya que las PDU se dirigirán a una población grande (preferiblemente a todos), su primer rasgo importante es que la invasividad sea la mínima. La presente invención propone tomar nota de los diferentes procesos fisiológicos y patológicos en determinados órganos, tejidos e incluso tipos de células mediante el análisis de los biomarcadores correspondientes en los líquidos corporales que se pueden obtener mediante métodos no invasivos o mínimamente invasivos, tales como, p. ej., plasma/suero, orina o saliva. Segundo, las PDU no se pueden basar en el factor de inducción ni en la patogenia de las enfermedades, ya que existen muchos. Tercero, para utilizarlas ampliamente, las PDU no deben ser muy caras, lo que, en particular, significa que se tiene que utilizar un número pequeño de tipos de biomarcadores que puedan ser analizados con la misma técnica.

Los biomarcadores utilizados para las PDU deben contar con un conjunto de parámetros que los hacen idóneos para tal tipo de prueba.

- 15 1. Especificidad o abundancia significativa en alguna célula/tejido/órgano (p. ej., una concentración al menos 5 veces mayor que en otras células/tejidos/órganos).
2. Capacidad para ser secretado al espacio extracelular y atravesar diferentes barreras dentro del organismo.
3. Presencia en cantidades detectables en los líquidos corporales que se puede obtener con una invasividad mínima.
- 20 4. Estabilidad
5. Que se puedan detectar con altas sensibilidad y especificidad a un coste relativamente bajo.

En las PDU se podrían utilizar las siguientes clases de moléculas:

1. Proteínas
2. ARNm y fragmentos de ARNm
- 25 3. miRNA
4. Fragmentos de ADN
5. Metilación del ADN
6. Lípidos
7. Azúcares

- 30 Sin embargo, algunos de estos posibles biomarcadores específicos de tejido tienen importantes desventajas, que hace su uso poco práctico o incluso imposible. Por ejemplo, la metilación del ADN, los lípidos y los azúcares no son suficientemente específicos para diferenciar entre diferentes tipos de tejidos y células. Además, los fragmentos de ADN aparecen en el espacio extracelular y en el torrente circulatorio proceden principalmente de las células que mueren (Lichtenstein et al., *Ann. New York. Acad. Sci.* 2001, 945: 239-249) y, así pues, el ADN acelular en circulación no se puede utilizar para detectar el estadio de las enfermedades que no vayan acompañadas de la muerte celular. Las proteínas y el ARNm son mejores candidatos para la PDU debido a su mayor especificidad o abundancia de tejido (Diez-Roux et al., *PLOS Biology*, 2011, 9: e1000582). No obstante, los ARNm son moléculas grandes que se degradan con facilidad por la acción de las nucleasas, por lo que sólo aparecen en el torrente circulatorio fragmentos pequeños de estas moléculas. Esto no descarta su uso como biomarcadores para la PDU, pero hace más difícil el desarrollo de las pruebas. Las proteínas son buenos candidatos, pero los métodos actuales para su detección son significativamente menos sensibles que las técnicas de detección de ácidos nucleicos. De igual forma, muchas proteínas son moléculas grandes y no consiguen atravesar la membrana celular ni otras barreras.

- 45 La presente invención propone utilizar los miRNA biomarcadores en las PDU por las siguientes razones: los miRNA son moléculas pequeñas, aparecen en el espacio extracelular, atraviesan las barreras del cerebro, del riñón y de la placenta, aparecen en muchos líquidos corporales, son estables, y los métodos actuales para su análisis son muy específicos y sensibles. Lo más importante es que los miRNA constituyen una clase enorme de moléculas diferentes, en la que al menos parte de los miRNA son muy abundantes en algunos sistemas de órganos, órganos, tejidos y/o células, lo que proporciona marcadores moleculares para todas las partes del cuerpo.

- 50 Los micro-ARN (miRNA) son una clase de ARN no codificantes cuyo producto final (miRNA maduro) es una

molécula de ARN funcional de aproximadamente 22 nt. Desempeña funciones importantes en la regulación de los genes destinatarios al fijarse a regiones complementarias de los transcritos mensajeros para reprimir su traducción o regular su degradación (Griffiths-Jones *Nucleic Acids Research*, 2006, 34, número de bases de datos: D140-D144). Con frecuencia, un miRNA puede actuar selectivamente sobre varios ARNm, y un ARNm puede ser regulado por varios miRNA que reconocen selectivamente diferentes regiones de la UTR en 3'. Una vez unido a un ARNm, el miRNA modula la expresión génica y la producción de la proteína al afectar a la traducción y a la estabilidad del ARNm (p. ej., Baek et al., *Nature*, 2008, 455: 64; Selbach et al., *Nature*, 2008, 455: 58; Ambros, *Nature*, 2004, 431: 350-355; Bartel, *Cell*, 2004, 116: 281-297; Cullen, *Virus Research*, 2004, 102: 3-9; He et al. *Nat. Rev. Genet.* 2004, 5: 522-531; y Ying et al., *Gene*, 2004, 342: 25-28). Hay otras clases de ARN pequeños menos caracterizados (revisado en Kim, *Mol. Cells*, 2005, 19: 1-15). Muchos de los miRNA son específicos de determinados órganos/tejidos/células o se sobreexpresan en ellos (véase, p. ej., Hua et al., *BMC Genomics* 2009, 10: 214; Liang et al., *BMC Genomics*, 2007, 8: 166; Landgraf et al., *Cell*, 2007, 129: 1401-1414; Lee et al., *RNA*, 2008, 14: 35-42). Debido a su pequeño tamaño, los miRNA consiguen atravesar la barrera hematoencefálica, del riñón y de la placenta en los líquidos corporales en los que son suficientemente estables (Rosenfeld et al., *Nature Biotech.* 2008, 26: 462-469; Mitchell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105: 10513-10518; Chen et al., *Cell Res.* 2008, 18: 997-1006; Chim et al. *Clin. Chem.* 2008, 54: 482-490; De Smaele et al., *Brain Res.* 2010, 1338: 100-111; Fichtlscherer et al., *Circ. Res.* 2010, 107: 677-684; Scholer et al., *Exp. Hematol.* 2010, 38: 1126-1130). El análisis de los miRNA específicos de célula o tejido en los líquidos corporales se propuso para la detección de la muerte celular *in vivo* (publicación de patente de los EE. UU. n.º 20090081640: Laterza et al., *Clin. Chem.* 2009, 55: 1977-1983). En varios estudios se ha demostrado que en el torrente circulatorio se incrementa la concentración de miRNA acelulares en circulación que abundan en el hígado (Zhang et al., *Clin. Chem.* 2010, 56: 1830-1838; Xu et al., *Mol. Carcinogenesis*, 2011, 50: 136-142). Por ejemplo, la cantidad de miRNA-122a, que es abundante en el hígado, está incrementada en el suero de los pacientes con hepatitis y carcinomas hepatocelulares, y los autores llegan a la conclusión que debido a esta inespecificidad para una enfermedad concreta, estos miRNA no se pueden utilizar como biomarcadores para el carcinoma hepatocelular (Zhang et al., *Clin. Chem.* 2010, 56: 1830-1838; Li et al. *Cancer Res.* 2010, 70: 9798-9807). En cambio, la presente invención demuestra que tal inespecificidad de enfermedad de los miRNA que abundan en un órgano/tejido/célula es una ventaja significativa cuando se utilizan como biomarcadores para el desarrollo de PDU.

La expresión y la concentración de los miRNA están reguladas mediante diferentes señales patológicas y fisiológicas. Algunos de los miRNA son característicos de una enfermedad concreta, tal como la hipoxia (Loscalzo, *J. Clin. Invest.* 2010, 120: 3815-3817; Pocock, *Pflugers Arch.* 2011, 461: 307-315), inflamación (Tili et al., *Int. Rev. Immunol.* 2009, 28: 264-284; Davidson-Moncada et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 2010, 1183: 183-194; Roy y Sen, *Physiol. Genomics*, 2011, 43: 557-565) o carcinogénica (Budhu et al., *J. Hematol. Oncol.* 2010, 3: 37; Zen y Zhang, *Med. Res. Rev.* 2012, 32: 326-348). Este fenómeno hace razonable la inclusión de tales miRNA como biomarcadores en las PDU de la invención. Un incremento de la concentración de estos miRNA en los líquidos corporales indicará la presencia de la correspondiente enfermedad general en el organismo, sin localizarla en un órgano, tejido o tipo de célula concretos. En términos generales, sería la misma estrategia que la propuesta más arriba para los miRNA abundantes en un órgano/tejido: el miRNA abundante en un órgano/tejido ayudará a detectar una enfermedad en un órgano o tejido concretos; por otra parte, un miRNA característico de una enfermedad general concreta ayudará a detectar la presencia de esta enfermedad en algún lugar del organismo, sin indicar una implicación de órganos o tejidos concretos. Un uso combinado de los miRNA biomarcadores que abundan en un sistema de órganos, órgano, tejido y/o tipo de célula, y miRNA biomarcadores que son característicos de una enfermedad general concreta proporcionarán un diagnóstico más preciso, es decir, la presencia de una enfermedad concreta en un órgano o tejido o tipo de célula concretos. Por ejemplo, el incremento de la concentración del miRNA característico de la hipoxia en el plasma, combinado con el incremento de la concentración del miRNA abundante en el corazón, ofrecerá un diagnóstico más específico de la isquemia de corazón obtenido por la PDU.

Así pues, en un aspecto, la presente invención da a conocer un método para detectar una enfermedad en un sistema de órganos de un sujeto, en donde dicho método comprende:

- a. medir la concentración de los miRNA abundantes en diversos sistemas de órganos en una muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- b. medir la concentración de los miRNA normalizadores seleccionados previamente en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- c. calcular las razones de las concentraciones de los miRNA medidos en las etapas (a) y (b);
- d. comparar las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (c) con las correspondientes razones de control, y
- e. (i) identificar que el sujeto está afectado por una enfermedad de un sistema de órganos concreto cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho sistema de órganos por sus correspondientes miRNA normalizadores calculadas en la etapa (c) son más altas que las correspondientes razones de control, o (ii) identificar que el sujeto no está afectado por una enfermedad de dicho sistema de órganos cuando las razones de

las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho sistema de órganos por sus correspondientes miRNA normalizadores calculadas en la etapa (c) no son más altas que las correspondientes razones de control.

La invención también da a conocer un método para detectar una enfermedad en un sistema de órganos de un sujeto, en donde dicho método comprende:

- 5 a. medir la concentración de al menos un miRNA abundante en dicho sistema de órganos en una muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- b. medir la concentración de un miRNA normalizador en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- c. calcular la razón de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b);
- 10 d. comparar la razón de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (c) con la correspondiente razón de control, y
- e. (i) identificar que el sujeto está afectado por una enfermedad de dicho sistema de órganos cuando la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c) es más alta que la correspondiente razón de control, o (ii) identificar que el sujeto no está afectado por una enfermedad de dicho sistema de órganos cuando la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c) no es más alta que la correspondiente razón de control.

El miRNA normalizador útil en los dos métodos anteriores puede ser, por ejemplo, miRNA ubicuo, miRNA expresado en muchos órganos, pero subexpresado en dicho sistema de órganos, o miRNA seleccionado experimentalmente por ser abundante en dicho sistema de órganos.

- 20 La razón de control de las concentraciones de los miRNA utilizados en los dos métodos anteriores puede ser un estándar predeterminado (p. ej., determinado con una población de sujetos de control [p. ej., emparejados por edad con el sujeto diagnosticado] sin enfermedades en el correspondiente sistema de órganos) o la razón de las concentraciones de los mismos miRNA en una muestra de líquido corporal procesada del mismo modo, procedente del mismo sujeto y que había sido recogida con anterioridad.

En una realización, los métodos anteriores implican la determinación de dos o más razones de miRNA.

- 25 En una realización de los métodos anteriores, los miRNA abundantes en un sistema de órganos se seleccionan de los miRNA recogidos en la tabla 2, que aparecerá más adelante.

En otra realización de los métodos anteriores, el sistema de órganos es el sistema nervioso central y las parejas miRNA/normalizador se seleccionan de las recogidas en la tabla 4, que aparecerá más adelante.

- 30 Aún en otra realización de los métodos anteriores, el sistema de órganos es el aparato respiratorio y las parejas miRNA/normalizador se seleccionan de las recogidas en la tabla 5, que aparecerá más adelante.

En otra realización más de los métodos anteriores, el sistema de órganos es el aparato digestivo (GI por sus iniciales en inglés "Gastrointestinal") y las parejas miRNA/normalizador se seleccionan de las recogidas en la tabla 7, que aparecerá más adelante.

- 35 En otro aspecto, la invención da a conocer un método para detectar una enfermedad en cualquier órgano de un sujeto, en donde dicho método comprende:

- a. medir la concentración de los miRNA abundantes en diferentes órganos en una muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- b. medir la concentración de los miRNA normalizadores seleccionados previamente en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- 40 c. calcular las razones de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b);
- d. comparar las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (c) con las correspondientes razones de control, y
- e. (i) identificar que el sujeto está afectado por una enfermedad de un órgano concreto cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho órgano por sus correspondientes miRNA normalizadores calculadas en la etapa (c) son más altas que las correspondientes razones de control, o (ii) identificar que el sujeto no está afectado por una enfermedad de dicho órgano cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho órgano por sus correspondientes miRNA normalizadores calculadas en la etapa (c) no son más altas que las correspondientes razones de control.

La invención también da a conocer un método para detectar una enfermedad de un órgano en un sujeto, en donde

dicho método comprende:

- a. medir la concentración de al menos un miRNA abundante en dicho órgano en una muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- 5 b. medir la concentración de un miRNA normalizador en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- c. calcular la razón de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b);
- d. comparar la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c) con la correspondiente razón de control, y
- 10 e. (i) identificar que el sujeto está afectado por una enfermedad de dicho órgano cuando la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c) es más alta que la correspondiente razón de control, o (ii) identificar que el sujeto no está afectado por una enfermedad de dicho órgano cuando la razón de las concentraciones de los miRNA calculados en la etapa (c) no es más alta que la correspondiente razón de control.

El miRNA normalizador de utilidad en los dos métodos anteriores puede ser, por ejemplo, miRNA ubicuo, miRNA expresado en muchos órganos, pero subexpresado en dicho órgano, o miRNA seleccionado experimentalmente por ser abundante en dicho órgano.

La razón de control de las concentraciones de los miRNA utilizados en los dos métodos anteriores puede ser un estándar predeterminado (p. ej., determinado con una población de sujetos de control [p. ej., emparejados por edad con el sujeto diagnosticado] sin enfermedades en el correspondiente órgano), o la razón de las concentraciones de los mismos miRNA en una muestra de líquido corporal procesada del mismo modo, procedente del mismo sujeto y que había sido recogida con anterioridad.

En una realización, los dos métodos anteriores implican la determinación de dos o más razones de miRNA.

En una realización de los dos métodos anteriores, los miRNA abundantes en un órgano se seleccionan de los miRNA recogidos en las tablas 1 y 2, que aparecerán más adelante.

En otra realización de los dos métodos anteriores, el órgano es un órgano digestivo (GI) y las parejas miRNA/normalizador se seleccionan de las recogidas en la tabla 9, que aparecerá más adelante.

En otro aspecto, la invención da a conocer un método para detectar una enfermedad en cualquier tejido de un sujeto, en donde dicho método comprende:

- a. medir las concentraciones de los miRNA abundantes en diferentes tejidos en una muestra de tejido corporal recogida del sujeto;
- 30 b. medir las concentraciones de los miRNA normalizadores en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- c. calcular las razones de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b);
- d. comparar las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (c) con las correspondientes razones de control, y
- 35 e. (i) identificar que el sujeto está afectado por una enfermedad de un tejido concreto cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho tejido por sus correspondientes miRNA normalizadores calculadas en la etapa (c) son más altas que las correspondientes razones de control, o (ii) identificar que el sujeto no está afectado por una enfermedad de dicho tejido cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho tejido por sus correspondientes miRNA normalizadores calculadas en la etapa (c) no son más altas que las correspondientes razones de control.
- 40

La invención también da a conocer un método para detectar una enfermedad en un tejido de un sujeto, en donde dicho método comprende:

- a. medir la concentración de al menos un miRNA abundante en dicho tejido en una muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- 45 b. medir la concentración de un miRNA normalizador en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- c. calcular la razón de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b);
- d. comparar la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c) con la correspondiente

razón de control, y

e. (i) identificar que el sujeto está afectado por una enfermedad de dicho tejido cuando la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c) es más alta que la correspondiente razón de control, o (ii) identificar que el sujeto no está afectado por una enfermedad de dicho tejido cuando la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c) no es más alta que la correspondiente razón de control.

El miRNA normalizador de utilidad en los dos métodos anteriores puede ser, por ejemplo, miRNA ubicuo, miRNA expresado en muchos tejidos, pero subexpresado en dicho tejido, o miRNA seleccionado experimentalmente por ser abundante en dicho tejido.

La razón de control de las concentraciones de los miRNA utilizados en los dos métodos anteriores puede ser un estándar predeterminado (p. ej., determinado con una población de sujetos de control [p. ej., emparejados por la edad con el sujeto diagnosticado] sin enfermedades en el correspondiente tejido), o la razón de las concentraciones de los mismos miRNA en una muestra de líquido corporal procesada del mismo modo, procedente del mismo sujeto y que había sido recogida con anterioridad.

En una realización, los dos métodos anteriores implican la determinación de dos o más razones de miRNA.

En una realización de los dos métodos anteriores, los miRNA abundantes en un tejido se seleccionan de los miRNA recogidos en las tablas 1 y 2 que aparecerán más adelante.

En otro aspecto, la invención da a conocer un método para detectar una enfermedad en cualquier tipo de célula de un sujeto, en donde dicho método comprende:

a. medir las concentraciones de los miRNA abundantes en diferentes tipos de células en una muestra de líquido corporal del sujeto;

b. medir las concentraciones de los miRNA normalizadores en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

c. calcular las razones de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b);

d. comparar las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (c) con las correspondientes razones de control, y

e. (i) identificar que el sujeto está afectado por una enfermedad de un tipo de células concreto cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho tipo de célula por sus correspondientes miRNA normalizadores calculadas en la etapa (c) son más altas que las correspondientes razones de los controles, o (ii) identificar que el sujeto no está afectado por una enfermedad de dicho tipo de célula cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho tipo de célula por sus correspondientes miRNA para normalización calculadas en la etapa (c) no son más altas que las correspondientes razones de control.

La invención también da a conocer un método para detectar una enfermedad de un tipo de células en un sujeto, en donde dicho método comprende:

a. medir la concentración de al menos un miRNA abundante en dicho tipo de células en una muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

b. medir la concentración de un miRNA normalizador en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

c. calcular la razón de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b);

d. comparar la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c) con la correspondiente razón de control, y

e. (i) identificar que el sujeto está afectado por una enfermedad de dicho tipo de célula cuando la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c) es más alta que la correspondiente razón de control, o (ii) identificar que el sujeto no está afectado por una enfermedad de dicho tipo de células cuando la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c) no es más alta que la correspondiente razón de control.

El miRNA normalizador de utilidad en los dos métodos anteriores puede ser, por ejemplo, miRNA ubicuo, miRNA expresado en muchos tipos de células, pero subexpresado en dicho tipo de células, o miRNA seleccionado experimentalmente por ser abundante en dicho tipo de células.

La razón de control de las concentraciones de los miRNA utilizada en los dos métodos anteriores puede ser un estándar predeterminado (p. ej., determinado con una población de sujetos de control [p. ej., emparejados por la

edad con el sujeto diagnosticado] sin enfermedades del correspondiente tipo de célula), o la razón de las concentraciones de los mismos miRNA en una muestra de líquido corporal procesada del mismo modo, procedente del mismo sujeto y que había sido recogida con anterioridad.

En una realización, los dos métodos anteriores implican la determinación de dos o más razones de miRNA.

- 5 En una realización de los dos métodos anteriores, el miRNA abundante en un tipo de célula se selecciona de los miRNA recogidos en las tablas 1 y 2, que aparecerán más adelante.

Los métodos descritos anteriormente se pueden combinar. Por ejemplo, la detección de una enfermedad de un sistema de órganos puede ir seguida de la determinación del órgano y/o tejido y/o tipo de célula, etc., afectado.

- 10 Cualquiera de los métodos descritos anteriormente también puede comprender la identificación adicional de si la enfermedad es cáncer o inflamación, en donde dicho método comprende:

a. medir la concentración de al menos un miRNA asociado al cáncer en una muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

b. medir la concentración de al menos un miRNA asociado la inflamación en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

- 15 c. medir la concentración de al menos un miRNA abundante en el sistema de órganos, órgano, tejido o tipo de célula implicado en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

d. medir la concentración de al menos un miRNA normalizador en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

- 20 e. calcular las razones por parejas de las concentraciones de los miRNA medidos en las etapas (a), (b), (c) y (d) (p. ej., razones a/b, a/c, a/d, b/c, b/d y c/d);

f. comparar las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (e) con las correspondientes razones predeterminadas características del cáncer y de la inflamación, y

- 25 g. (i) identificar que la enfermedad es cáncer cuando las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (e) están en el margen predeterminado característico del cáncer, o (ii) identificar que la enfermedad es inflamación cuando las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (e) están en un margen predeterminado característico de la inflamación.

En una realización del método anterior, los miRNA asociados al cáncer y a la inflamación se seleccionan de los miRNA recogidos en la tabla 3, que aparecerá más adelante.

- 30 En una realización del método anterior, la enfermedad tiene que ver con el pulmón y las parejas de miRNA se seleccionan de las recogidas en la tabla 6, que aparecerá más adelante.

En una realización del método anterior, la enfermedad tiene que ver con el aparato digestivo (GI) y las parejas de miRNA se seleccionan de las recogidas en la tabla 8, que aparecerá más adelante.

En una realización del método anterior, la enfermedad tiene que ver con el aparato respiratorio o el aparato digestivo (GI) y las parejas de miRNA se seleccionan de las recogidas en la tabla 11, que aparecerá más adelante.

- 35 Un método parecido se puede aplicar para diferenciar el cáncer, o la inflamación, de la hipoxia.

Cualquiera de los métodos anteriores puede ir seguido de la administración de una prueba diagnóstica específica de a enfermedad en el sujeto.

Cualquiera de los métodos anteriores puede ir seguido de la administración de un tratamiento terapéutico al sujeto al que se le ha diagnosticado que tiene una enfermedad.

- 40 Cualquiera de los métodos anteriores puede ir seguido de la incorporación del sujeto a un ensayo clínico (esto se puede aplicar tanto a los sujetos a los que se ha diagnosticado una enfermedad como a los sujetos a los que se ha diagnosticado que no tienen ninguna enfermedad).

- 45 Los métodos de la invención descritos más arriba se pueden aplicar para la detección de enfermedades en cualquier sujeto, entre los que se incluyen los sujetos que no tienen síntomas clínicos indicativos de una enfermedad de dicho sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula.

En un aspecto separado, la descripción da a conocer un método para identificar un compuesto útil para tratar o enlentecer la progresión de una enfermedad de un sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula, en donde dicho método comprende:

- a. medir la concentración de al menos un miRNA abundante en dicho sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula en una o varias muestras de líquidos corporales recogidas de un sujeto que tiene dicha enfermedad de dicho sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula, en donde dicha una o varias muestras de líquidos corporales se recoge antes de la administración de un compuesto problema;
 - 5 b. medir la concentración de un miRNA normalizador en la misma muestra o muestras de líquidos corporales del sujeto recogidas antes de la administración del compuesto problema;
 - c. calcular la razón de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b) para cada una de las muestras de líquidos corporales recogidas del sujeto antes de la administración del compuesto problema;
 - d. medir la concentración del mismo miRNA que en la etapa (a) en una o varias muestras de líquidos corporales del sujeto después de la administración del compuesto problema;
 - 10 e. medir la concentración del mismo miRNA normalizador que en la etapa (b) en la misma muestra o muestras de líquidos corporales recogidas del sujeto después de la administración del compuesto problema;
 - f. calcular la razón de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (d) y (e) para cada una de las muestras de líquidos corporales recogidas del sujeto después de la administración del compuesto problema;
 - 15 g. comparar la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en las etapas (c) y (f), y
 - h. (i) identificar que el compuesto problema es útil para enlentecer la progresión o para tratar dicha enfermedad de dicho sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula si la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (f) es más baja que la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c); (ii) identificar que el compuesto problema no es útil para enlentecer la progresión ni para tratar dicha enfermedad de dicho sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula si la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (f) no es más baja que la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c).
 - 20
- En una realización del método anterior, la enfermedad es cáncer o inflamación o hipoxia y el miRNA se selecciona de los miRNA recogidos en la tabla 3, que aparecerá más adelante.
- En otro aspecto, la descripción da a conocer un método para determinar la toxicidad de un compuesto (p. ej., un compuesto que se prueba en un ensayo clínico) o un factor ambiental (p. ej., alérgeno, tabaquismo, UV, radiación, amianto, etc.) en un sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula en un sujeto sin enfermedades de dicho sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de células, en donde dicho método comprende:
- 25
- a. medir la concentración de al menos un miRNA abundante en dicho sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula en una o varias muestras de líquidos corporales recogidas del sujeto antes de que el sujeto haya quedado expuesto al compuesto o al factor ambiental;
- 30 b. medir la concentración de un miRNA normalizador en la misma muestra o muestras de líquidos corporales recogidas del sujeto antes de que el sujeto haya quedado expuesto al compuesto o al factor ambiental;
- c. calcular la razón de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b) para cada una de las muestras de líquidos corporales recogidas del sujeto antes de que el sujeto haya quedado expuesto al compuesto o al factor ambiental;
- 35 d. medir la concentración del mismo miRNA abundante en dicho sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula en una o varias muestras de líquidos corporales recogidas del sujeto después de que el sujeto haya quedado expuesto al compuesto o al factor ambiental;
- e. medir la concentración del mismo miRNA para normalización en la misma muestra o muestras de líquidos corporales recogidas del sujeto después de que el sujeto haya quedado expuesto al compuesto o al factor ambiental;
- 40 f. calcular la razón de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (d) y (e) para cada una de las muestras de líquidos corporales;
- g. comparar la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en las etapas (c) y (f), y
- h. (i) identificar que el compuesto o el factor ambiental no es tóxico para dicho sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula si la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (f) no es más alta que la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c); (ii) identificar que el compuesto o el factor ambiental es tóxico para dicho sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula si la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (f) es más alta que la razón de las concentraciones de los miRNA calculada en la etapa (c).
- 45
- 50 En una realización, los dos métodos anteriores implican la determinación de las razones de dos o más miRNA.

En una realización de los dos métodos anteriores, el miRNA abundante en un sistema de órganos u órgano o tejido o tipo de célula se selecciona de los miRNA recogidos en las tablas 1 y 2, que aparecerán más adelante.

En una realización de los dos métodos anteriores, el sistema de órganos es sistema nervioso central y las parejas miRNA/normalizador se seleccionan de las recogidas en la tabla 4, que aparecerá más adelante.

- 5 En una realización de los dos métodos anteriores, el sistema de órganos es el aparato respiratorio y las parejas miRNA/normalizador se seleccionan de las recogidas en la tabla 5, que aparecerá más adelante.

En una realización de los dos métodos anteriores, el sistema de órganos es el aparato digestivo (GI) y las parejas miRNA/normalizador se seleccionan de las recogidas en la tabla 7, que aparecerá más adelante.

- 10 Cada una de las etapas de medición de los métodos descritos más arriba no tiene que realizarse en el orden específico que se recoge más arriba.

Los sujetos utilizados en los métodos de la presente invención incluyen, p. ej., humanos, animales veterinarios y animales experimentales que sean modelos de enfermedades. Los ejemplos no limitantes de los miRNA biomarcadores y de los miRNA normalizadores que resultan útiles en los métodos descritos más arriba de la presente invención se dan a conocer, p. ej., en las tablas 1 a 11, que aparecerán más adelante.

- 15 Los ejemplos no limitantes de las muestras de líquidos corporales que se pueden utilizar en los métodos de la invención incluyen, p. ej., orina, plasma sanguíneo y suero. Si se utiliza la orina, se prefiere que la orina de la muestra haya permanecido en la vejiga durante menos de 4 horas.

Los ejemplos no limitantes de los métodos para determinar la cantidad de miRNA en los métodos de la invención incluyen, p. ej., hibridación, RT-PCR y secuenciación directa.

- 20 En algunas realizaciones, los métodos de la descripción comprenden (p. ej., a modo de etapa inicial) la etapa de recoger una muestra de líquido corporal del sujeto.

En una realización (aplicable a cualquiera de los métodos anteriores de la invención), el método también incluye una etapa de reducir o eliminar la degradación del miRNA. Ejemplos no limitantes de los métodos útiles para reducir o eliminar la degradación de los miRNA incluyen, p. ej., añadir un inhibidor de ARNasas, tratamiento con cloruro de guanidina, tratamiento con isotiocianato de guanidina, tratamiento con *N*-lauroilsarcosina, tratamiento con dodecilsulfato de sodio (SDS) y una combinación de los mismos.

- 25 Junto con los métodos diagnósticos y de detección de más arriba, la presente descripción también da a conocer diferentes kits que comprenden uno o varios conjuntos de cebadores y/o sondas específicos para la detección del miRNA deseado. Tales kits pueden además incluir conjuntos de cebadores y/o sondas específicos para la detección del miRNA normalizador. Los ejemplos no limitantes de combinaciones de cebador o sonda en los kits son los que siguen:

1. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-1, 22, 30a-3p, 30e-3p, 133a, 133b, 197, 208a, 208b, 221, 222, 302a, 302c, 367, 378, 499-5p y 30e*.
- 35 2. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-1, 22, 95, 133a, 133b, 140 y 206.
3. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-15b, 18b, 21, 34b, 126, 135b, 142-3p, 142-5p, 146, 146b-5p, 155, 199b-5p, 200c, 205, 211, 223, 224, 302b, 375, 449a, 449b, 450b-5p, 486, 492, 522, 566, 574-3p, 620, 650, 766 y 886-5p.
- 40 4. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-34b, 135b, 146, 146b, 147b, 155, 199b-5p, 200b, 200c, 205, 219-5p, 223, 302b y 375.
5. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-30e-3p, 122a, 130b, 136, 148a, 194, 376c, 455-3p, 518b, 616, 801, 885-5p, 17*, 30d* y 194*.
- 45 6. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-10a, 10b, 30a-3p, 30c, 107, 135a, 135b, 184, 187, 190, 194, 196b, 200a, 204, 211, 324-5p, 489, 500, 501-5p, 502-3p, 502-5p, 503, 506, 508-3p, 508-5p, 509-3p, 509-5p, 510, 532-5p, 768-3p, 886-3p, 886-5p, 891a, 10b*, 30a*, 30c-2*, 30e*, 200a*, 200b*, 424* y 500*.
7. cebadores o sondas específicos para al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7g, 18, 23b, 26a, 26b, 27b, 28, 106b, 143, 145, 152, 218, 221, 223, 296, 374, 422b y 451.
- 50 6. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-10b, 30, 99a, 139-3p, 139-5p, 193a-5p, 196a, 224, 335, 365, 378/378*, 422b, 494, 518d-3p, 642a-3p, 708, 10b*

y 335*.

7. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-let-7a, 10b, 26a, 30a-3p, 30a-5p, 125b, 126, 145, 146, 195, 196a-2, 196b, 205, 206, 335, 339-5p, 378, 516-5p, 517c, 519c, 520g, 520h, 525 y 1246.
- 5 8. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7a, let-7b, let-7c, 10b, 17-3p, 26a, 100, 125a, 125b, 127, 195, 199a-5p, 202, 214, 298, 382, 503, 672, 741, 742, 883-3p, 199a* y 202*.
9. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-10a, 10b, 31, 34b, 34c, 135a, 135b, 424 y 449.
- 10 10. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7c, 10b, 26a, 99a, 100, 125a-5p, 125b, 130a, 140, 143, 145, 195, 196b, 199b, 204, 214, 222, 939 y 199*.
11. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7a, let-7c, let-7g, 10b, 100, 101, 125a-5p, 125b, 130a, 134, 140, 143, 145, 186, 195, 196b, 197, 199a, 199b, 204, 214, 218, 222, 320, 424, 497, 154* y 199a*.
- 15 12. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7c, 1, 23b, 24, 27b, 28, 34a, 99a, 100, 125b, 130a, 143, 145, 147b, 187, 188-3p, 199b-5p, 205, 214, 222, 328, 373, 410, 455-5p y 490-3p.
13. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-15b, 34a, 34b, 34c, 127, 134, 135a, 135b, 187, 202, 204, 370, 372, 376a, 382, 424, 449, 465a-5p, 465b-5p, 506, 508, 509, 510, 514, 517a, 517c, 871-5p, 871-3p, 888, 202* y 888*.
- 20 14. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en familia miR-Let-7, 10a, 17, 18a, 19a, 19b, 20a, 92, 21, 22, 23a, 24, 27a, 27b, 29a, 31, 34a, 98, 100, 106a, 126, 130a, 133a, 143, 145, 146a, 199a-3p, 210, 221, 222, 345, 365, 382, 409-3p, 431, 484, 495, 532-5p, 939, 27a*, 30a*, 30e*, 93*, 126*, 130b* y 222*.
- 25 15. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-15a, 15b, 126, 139, 142-3p, 142-5p, 146, 150, 155, 181a, 181b, 181d, 223, 302b y 342.
16. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-15a, 15b, 17-5p, 20b, 106a, 106b, 142-3p, 142-5p, 146, 149, 150, 155, 181a, 181b, 181c, 182, 183, 205, 213 y 342.
- 30 17. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7g, 15a, 20b, 21, 106b, 140, 142-3p, 146, 146b, 150, 181b, 181d, 342 y 431.
18. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7g, 9, 15a, 15b, 17, 19b, 20a, 31, 106a, 124a, 124b, 128a, 137, 142-3p, 146b-5p, 150, 186, 191, 197, 222, 223, 328, 342-3p, 423, 431, 454, 484, 766, 27* y 223*.
- 35 19. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-142-3p, 146a, 155, 181a, 205, 223 y 424.
20. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-142, 150 y 342.
- 40 21. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7i, 1, 7, 135a, 135b, 206 y 345.
22. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7g, 7, 15a, 26b, 27a, 99b, 124, 127, 132, 134, 137, 139, 152, 181a, 187, 195, 192, 202, 299, 302b, 323, 324-3p, 324-5p, 328, 330-3p, 331, 335, 340, 365, 369-3p, 375, 379, 382, 409-5p, 429, 431, 432, 455-5p, 483-5p, 514, 126*, 182* y 202*.
- 45 23. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-7, 18a, 21, 29a, 34a, 103, 127-3p, 129-3p, 130b, 134, 135a, 135b, 136, 141, 148a, 182, 183, 184, 192, 193a-3p, 193a-5p, 195, 199a-3p, 199a-5p, 200b, 200c, 204, 216a, 216b, 217, 224, 340, 365, 367, 374a, 374b, 375, 376a, 376c, 379, 382, 383, 429, 432, 451, 455-5p, 485-5p, 487b, 497, 539, 543, 642, 758, 939, 130b*, 136*, 183*, 200b* y 493*.
- 50 24. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-7, 9,

- 21, 127-3p, 130b, 184, 195, 216a, 216b, 217, 376a, 376c, 497, 939 y 493*.
25. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-31, 141, 143, 145, 147b, 192, 194, 200a, 200b, 200bN, 200c, 200cN, 215, 219-2-3p, 321, 375, 378, 422a, 429, 450b-5p, 487a, 490-3p, 492, 504, 565, 574-3p, 622, 650, 801, 143* y 200b*.
- 5 26. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-31, 141, 143, 192, 194, 200a, 200b, 200bN, 200c, 200cN, 215, 321, 375 y 429.
27. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-31, 106a, 106b, 143, 145, 148a, 203, 205, 210, 211 y 221.
- 10 28. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-7, 26a, 26b, 29c, 31, 106a, 106b, 124b, 130b, 141, 145, 148a, 182, 188, 192, 197, 203, 375 y 650.
29. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7a, 7, 9, 96, 98, 99a, 103, 107, 124a, 125a, 125b, 127, 128a, 132, 134, 135a, 137, 138, 149, 153, 154, 181a, 181b, 181c, 182, 183, 184, 204, 211, 212, 213, 218, 219, 221, 222, 299-3p, 299-5p, 323-3p, 324-5p, 328, 329, 330, 331, 335, 337, 338, 342, 346, 369-3p, 369-5p, 370, 379, 381, 382, 383, 409-3p, 411, 425, 432, 433-5p, 485-3p, 485-5p, 487b, 488, 491-5p, 494, 495, 496, 504, 539, 541, 543, 584, 656, 668, 758, 874, 889, 935, 939, 1193, 1197 y 9*.
- 15 30. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-7, 9, 98, 124a, 125a, 125b, 128a, 132, 134, 135a, 137, 138, 154, 182, 183, 213, 218, 323-3p, 329, 337, 369-3p, 369-5p, 370, 381, 382, 409-3p, 425, 433-5p, 483-3p, 485-5p, 487b, 494, 495, 496, 541, 543, 656, 668, 874, 889, 935, 939 y 9*.
- 20 31. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-9, 124a, 125a, 125b, 128a, 132, 134, 181c, 212, 213, 222, 330-3p, 338-5p, 342, 381, 382, 425, 433 y 491-5p.
32. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-9, 96, 99a, 103, 124a, 125b, 128a, 132, 134, 137, 138, 181a, 181b, 212, 219, 221, 222, 324-5p, 328, 330, 331, 335-5p, 338, 369-3p, 381, 382, 383, 425, 433-5p, 485-5p y 491-5p.
- 25 33. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-7, 124a, 128a, 132 y 212.
34. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-9, 103, 124a, 125b, 128, 132, 134, 137, 138, 181a, 181b, 181c, 204, 212, 213, 218, 338, 381, 382, 425, 432 y 489.
- 30 35. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-103, 134, 138, 182, 183, 222, 323-3p, 369, 381 y 382.
36. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-218, 219, 338, 451 y 486.
- 35 37. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-7, 132, 212, 213 y 328.
38. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-34b, 135b, 146, 146b-5p, 155, 199b-5p, 200c, 205, 223, 302b y 375.
- 40 39. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-15b, 18b, 21, 126, 142-3p, 142-5p, 224, 449a, 449b, 450b-5p, 486, 492, 522, 566, 574-3p, 650, 766 y 886-5p.
40. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-147b, 200b y 219-5p.
41. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-31, 130b, 136, 141, 143, 145, 148a, 192, 203, 215, 375, 376c, 429, 455-5p y 650.
- 45 42. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-106a, 106b, 205 y 210, y 221.
43. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-7, 26a, 26b, 26c, 106a, 106b, 124b, 182, 188 y 197.
44. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-194,

200a, 200b, 200c y 321.

45. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-147b, 194, 200a, 200b, 200c, 219-3p, 378, 450-5p, 487a, 490-3p, 492, 504, 565, 574-3p, 622, 801, 143* y 200b*.
- 5 46. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-122a, 194, 518b, 616, 801, 885-5p, 17*, 30d* y 194*.
47. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-7, 18a, 21, 29a, 34a, 103, 127-3p, 129-3p, 134, 135a, 135b, 182, 183, 184, 193a-3p, 193a-5p, 195, 199a-3p, 199a-5p, 200b, 200c, 204, 216a, 216b, 217, 224, 340, 365, 367, 374a, 374b, 376a, 379, 382, 383, 432, 451, 485-5p, 487b, 497, 539, 543, 642, 758, 939, 130b*, 136*, 183*, 200b* y 493*.
- 10 48. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-1, 22, 95, 133a, 133b, 140 y 206.
49. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7a, 7, 9, 124a, 125a, 125b, 128a, 132, 134, 135a, 137, 138, 181a, 181c, 182, 184, 211, 212, 213, 218, 219, 222, 323-3p, 338-5p, 369, 381, 382, 425, 433-5p, 485-5p, 491-5p, 539, 541, 543, 656, 874, 935 y 9*.
- 15 50. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-7, 9, 98, 124a, 125a, 125b, 128a, 132, 134, 135a, 137, 138, 154, 182, 183, 213, 218, 323-3p, 329, 337, 369-3p, 369-5p, 370, 381, 382, 409-3p, 425, 433-5p, 483-3p, 485-5p, 487b, 494, 495, 496, 541, 543, 656, 668, 874, 889, 935, 939 y 9*.
- 20 51. cebadores o sondas específicos de miR-330-3p y miR-342.
52. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-96, 99a, 103, 181b, 221, 324-5p, 328, 330, 331, 335-5p y 383.
53. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-103, 181b, 204, 432 y 489.
- 25 54. cebadores o sondas específicos de miR-103 y miR-183.
55. cebadores o sondas específicos de miR-451 y miR-486.
56. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-22, 133a, 221, 222 y 30e*.
- 30 57. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-1, 30a-3p, 30e-3p, 133b, 197, 208a, 208b, 302a, 302c, 367, 378 y 499-5p.
58. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7, 10a, 17, 18a, 19a, 19b, 20a, 21, 23a, 24, 27a, 27b, 29a, 31, 34a, 92, 98, 100, 106a, 126, 130a, 143, 145, 146a, 199a-3p, 210, 345, 365, 382, 409-3p, 431, 484, 495, 532-5p, 939, 27a*, 30a*, 93*, 126*, 130b* y 222*.
- 35 59. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7a, Let-7c, 10b, 26a, 100, 125a, 125b, 130a, 140, 143, 145, 195, 196b, 199a, 199b, 204, 214, 222, 424, 517c y 199a*.
60. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-10a, 31, 34b, 34c, 135a, 135b y 449.
- 40 61. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7b, 127, 202, 298, 382, 503, 672, 741, 742, 883-3p y 202*.
62. cebadores o sondas específicos de miR-99a y miR-939.
63. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7g, 101, 134, 186, 197, 218, 320, 497 y 154*.
- 45 64. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-126, 146, 205, 206, 335, 339-5p, 378, 516-5p, 519c, 520g, 520h, 525 y 1246.
65. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-7, 127 y 493*.

66. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7i, 1, 135a, 135b, 206 y 345.
- 5 67. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7g, 15a, 26b, 27a, 99b, 124, 132, 134, 137, 139, 152, 181a, 187, 195, 192, 202, 299, 302b, 323, 324-3p, 324-5p, 328, 330-3p, 331, 335, 340, 365, 369-3p, 375, 379, 382, 409-5p, 429, 431, 432, 455-5p, 483-5p, 514, 126*, 182* y 202*.
68. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-9, 21, 130b, 184, 195, 216a, 216b, 217, 376a, 376c, 497 y 939.
- 10 69. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-15a, 15b, 142-3p, 142-5p, 146, 150, 181a, 181b, 181d, 205, 342 y 423.
70. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-126, 139, 155, 223 y 302b.
71. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-17-5p, 20b, 106a, 106b, 149, 155, 181c, 182, 183 y 213.
- 15 72. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7g, 20b, 21, 106b, 140, 146b y 431.
73. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-Let-7g, 9, 17, 19b, 20a, 31, 106a, 124a, 124b, 128a, 137, 186, 191, 197, 222, 223, 328, 431, 454, 484, 766, 27* y 223*.
- 20 74. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-155, 223 y 424.
75. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en familia miR-Let-7, 10b, familia 17-92, 21, 29a, 31, 34a, 106a, 106b, 126, 146a, 146b, 155, 184, 195, familia 200/141, 210, 373, 375, 423-5p, 451 y 486.
- 25 76. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-21, 31, 34a, 125-5p, 125b, 126, 146a,b, 150, 155, 221, 222 y 223.
77. cebadores o sondas específicos de al menos dos miRNA seleccionados del grupo que consiste en miR-270, 373 y 424.
- 30 78. (i) cebadores o sondas específicos de al menos un miRNA seleccionado del grupo que consiste en miR-128, miR-132 y miR-874, y (ii) cebadores o sondas específicos de al menos un miRNA seleccionado del grupo que consiste en miR-9, miR-181a, miR-491-5p y miR-141.
79. (i) cebadores o sondas específicos de al menos un miRNA seleccionado del grupo que consiste en miR-134, miR-323-3p y miR-382, y (ii) cebadores o sondas específicos de al menos un miRNA seleccionado del grupo que consiste en miR-127 y miR-370.
- 35 80. (i) cebadores o sondas específicos de al menos un miRNA seleccionado del grupo que consiste en miR-34b, miR-486-5p y miR-192, y (ii) cebadores o sondas específicos de al menos un miRNA seleccionado del grupo que consiste en miR-142-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-223 y miR-409-3p.
81. cebadores o sondas específicos de miR-34b y miR-155.
82. cebadores o sondas específicos de miR-146b-5p y al menos uno de miR-486b-5p y miR-192.
- 40 83. (i) cebadores o sondas específicos de al menos un miRNA seleccionado del grupo que consiste en miR-192, miR-194, miR-203 y miR-215, y (ii) cebadores o sondas específicos de al menos un miRNA seleccionado del grupo que consiste en miR-30e-3p, miR-145 y miR-148a.
84. (i) cebadores o sondas específicos de miR-215 y (ii) cebadores o sondas específicos de al menos un miRNA seleccionado del grupo que consiste en miR-30e-3p, miR-194 y miR-203.
- 45 85. (i) cebadores o sondas específicos de miR-203 y (ii) cebadores o sondas específicos de al menos uno de miR-148a y miR-192.
86. (i) cebadores o sondas específicos de miR-194 y (ii) cebadores o sondas específicos de al menos uno de miR-148a y miR-192.

87. cebadores o sondas específicos de al menos una pareja de miRNA seleccionada del grupo que consiste en miR-194/miR-145, miR-194/miR-148a, miR-194/miR-30e-3p, miR-215/miR-203, miR-203/miR-30e-3p, miR-203/miR-148a, miR-192/miR-145, miR-192/miR-148a y miR-192/miR-30e-3p.

5 88. cebadores o sondas específicos de al menos una pareja de miRNA seleccionada del grupo que consiste en miR-192/miR-126, miR-155/miR-126, miR-145/miR-126, miR-155/miR-30e-3p, miR-192/miR-30e-3p, miR-155/miR-409-3p, miR-486-5p/miR-17-5p, miR-155/miR-17-5p, miR-192/miR-17-5p, miR-146b-5p/miR-31, miR-155/miR-31, miR-192/miR-31, miR-486-5p/miR-155, miR-192/miR-155, miR-145/miR-155, miR-146b-5p/miR-155, miR-486-5p/miR-203, miR-192/miR-203, miR-145/miR-203, miR-192/miR-215 y miR-155/miR-215.

10 89. cebadores o sondas específicos de al menos una pareja de miRNA seleccionada del grupo que consiste en miR-17-5p/miR-155, miR-192/miR-155, miR-215/miR-155, miR-192/miR-30e-3p, miR-155/miR-30e-3p y miR-146b-5p/miR-30e-3p.

Los kits de la invención pueden además comprender medios para el aislamiento y purificación de los miRNA.

Los kits de la invención pueden además comprender instrucciones de uso.

15 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-C son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los miRNA en el plasma de pacientes con trastorno cognitivo leve (TCL), con enfermedad de Alzheimer (EA), y controles emparejados por edad (CEE). La concentración de miR-7 (A), miR-132 (B) y miR-874 (C) se normalizó por miR-141. Aquí y en las otras gráficas de cajas y bigotes, la caja indica la distribución del 50% de los resultados y la barra por encima y por debajo de la caja abarcan el 80% de los resultados. Los puntos señalan los valores del ensayo localizados fuera del 80% de los datos. La mediana del valor de los ensayos se indica mediante la línea de dentro de la caja. Las concentraciones normalizadas de los miRNA se presentan en el eje de ordenadas en unidades relativas (escala logarítmica).

25 Las figuras 2A-E son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los miRNA en el plasma de pacientes con TCL, con EA (EA), y en los controles emparejados por edad. La concentración de miR-7 (A), miR-128 (B), miR-132 (C), miR-382 (D) y miR-874 (E) se normalizó por miR-9.

Las figuras 3A-E son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los miRNA en el plasma de pacientes con TCL, con EA, y en los controles emparejados por edad. La concentración de miR-132 (A), miR-134 (B), miR-323-3p (C), miR-382 (D) y miR-874 (E) se normalizó por miR-127-3p.

30 Las figuras 4A-G son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los miRNA en el plasma de pacientes con TCL, con EA, y en los controles emparejados por edad. La concentración de miR-7 (A), miR-128 (B), miR-132 (C), miR-134 (D), miR-323-3p (E), miR-382 (F) y miR-874 (G) se normalizó por miR-181a.

Las figuras 5A-H son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los miRNA en el plasma de pacientes con TCL, con EA, y en los controles emparejados por edad. La concentración de miR-7 (A), miR-125 (B), miR-128 (C), miR-132 (D), miR-134 (E), miR-323-3p (F), miR-382 (G) y miR-874 (H) se normalizó por miR-370.

35 Las figuras 6A-H son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los miRNA en el plasma de pacientes con TCL, con EA, y en los controles emparejados por edad. La concentración de miR-7 (A), miR-125 (B), miR-128 (C), miR-132 (D), miR-134 (E), miR-323-3p (F), miR-382 (G) y miR-874 (H) se normalizó por miR-491-5p.

40 En las figuras 7A-C se presentan los análisis de curvas ROC (curvas de eficacia diagnóstica) de la diferenciación entre los pacientes con TCL (TCL) y los controles emparejados por edad (CEE) obtenidos con miR-128 (A), miR-132 (B) y miR-874 (C) normalizados por miR-491-5p. Se informa de las áreas bajo la curva (ABC) ROC. La sensibilidad, especificidad y exactitud para cada pareja biomarcador/normalizador se calculan para el punto de «corte» (indicado como un punto en cada gráfico); el punto de corte es la razón biomarcador/normalizador a la cual una muestra tiene la misma probabilidad de pertenecer al grupo de CEE o al de TCL.

45 En las figuras 8A-C se presentan los análisis de curvas ROC (curvas de eficacia diagnóstica) de la diferenciación entre los pacientes con TCL (TCL) y los controles emparejados por edad (CEE) obtenidos con miR-134 (A), miR-323-3p (B) y miR-382 (C) normalizados por miR-370. Se informa de las áreas bajo la curva (ABC) ROC. La sensibilidad, especificidad y exactitud de cada pareja biomarcador/normalizador se calculan para el punto de «corte» (indicado como un punto en cada gráfico); el punto de corte es la razón biomarcador/normalizador a la cual una muestra tiene la misma probabilidad de pertenecer al grupo de CEE o al de TCL.

50 En las figuras 9A-F se presentan los análisis de la asociación entre miR-128 y miR-132 (A), miR-128 y miR-874 (B), miR-132 y miR-874 (C), miR-134 y miR-323-3p (D), miR-134 y miR-382 (E), y miR-382 y miR-323-3p (F). Se compararon los valores de Ct de diferentes parejas de biomarcadores y se calcularon los coeficientes de correlación de rangos de Spearman, r , con intervalos de confianza al 95% (MIN y MAX).

Las figuras 10A-D son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los biomarcadores miR-34b y miR-486-5p, que abundan en los pulmones, en el plasma de pacientes con asma y neumonía frente a controles no fumadores (A y B) y en el plasma de pacientes con EPOC y CPNM frente a controles fumadores (C y D). La concentración de los miRNA biomarcadores se normalizó por miR-409-3p, que se expresa en muchos órganos, pero que está subexpresado en el pulmón.

Las figuras 11A-H son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los biomarcadores miR-34b y miR-486-5p, que abundan en los pulmones, en el plasma de pacientes con neumonía y asma (PNA) frente a controles no fumadores. La concentración de los miRNA biomarcadores se normalizó por otro miRNA abundante en el pulmón: A, B por miR-155; C, D por miR-146b-5p; E, F por miR-223; G, H por miR-142-5p.

Las figuras 12A-H son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los biomarcadores miR-34b y miR-486-5p, que abundan en los pulmones, en el plasma de pacientes con EPOC y CPNM frente a controles fumadores. La concentración de los miRNA biomarcadores se normalizó por miR-409-3p o por un miRNA abundante en el pulmón: A, B por miR-155; C, D por miR-146b-5p; E, F por miR-223; G, H por miR-142-5p; I, J por miR-409-3p.

Las figuras 13A-J son gráficos que muestran la comparación de la concentración de miR-192 en el plasma de pacientes con neumonía y asma (PNA) frente a controles no fumadores (A-E) y en el plasma de pacientes con EPOC y CPNM frente a controles fumadores (F-J). La concentración de los miRNA biomarcadores se normalizó por miR-409-3p, que se expresa en muchos órganos, pero que está subexpresado en el pulmón, o por un miRNA abundante en el pulmón: A, F por miR-409-3p; B, G por miR-155; C, H por miR-146b-5p; D, I por miR-223; E, J por miR-142-5p.

Las figuras 14A-C son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los biomarcadores miR-34b (A), miR-486-5p (B) y miR-192 (C) en el plasma de pacientes con neumonía, asma (PNA), EPOC y CPNM frente a controles combinados (no fumadores y fumadores). La concentración de los miRNA biomarcadores se normalizó por miR-409-3p (A), o por miR-223 (B) y miR-146b-5p (C) abundantes en el pulmón.

Las figuras 15A-C son gráficos que muestran la comparación de la concentración de los biomarcadores miR-34b, miR-486-5p y miR-192 en el plasma de todos los pacientes con enfermedades inflamatorias del pulmón (asma, neumonía y EPOC) frente a pacientes con CPNM. La concentración de los miRNA biomarcadores se normalizó por diferentes miRNA abundantes en el pulmón: A por miR-155; B, C por miR-146b-5p.

Las figuras 16A-M son gráficos que muestran la comparación de la concentración de miR-192 (A, E, I), miR-194 (B, F, J), miR-203 (C, G, K) y miR-215 (D, H, L), abundantes en órganos de aparato digestivo (GI), en el plasma de pacientes con cáncer de esófago (CE), cáncer gástrico (CG), cáncer colorrectal (CCR) y enfermedad de Crohn (EC) frente a los controles. La concentración de los miRNA biomarcadores se normalizó por el miR-30e-3p ubicuo o por otros miRNA abundantes en el aparato digestivo: A-D por miR-30e-3p; E-H por miR-148a; I-L por miR-145. A-L: pacientes con las enfermedades indicadas frente a los controles; M: un gráfico que muestra la comparación de la concentración de miR-203 y miR-192 en el plasma de los pacientes con enfermedades del aparato digestivo estudiadas (Enfermedad) frente a los controles. Todas las concentraciones se normalizaron por el miR-30e-3p ubicuo y se presentan en unidades relativas (escala logarítmica).

Las figuras 17A-G son gráficos que muestran la comparación de diferentes razones de las concentraciones de miRNA en el plasma de todos los pacientes con cáncer (cáncer de esófago, gástrico y colorrectal) frente a los pacientes con la enfermedad de Crohn. A: miR-215/miR-30e-3p; B: miR-203/miR-148a; C: miR-194/miR-148a; D: miR-192/miR-203; E: miR-215/miR-203; F: miR-215/miR-194; G: miR-194/miR-192.

En las figuras 18A-I se muestra la comparación de diferentes razones de las concentraciones de miRNA en el plasma de los pacientes con cánceres de determinados órganos digestivos. A-C: cáncer de esófago (CE) frente a cáncer gástrico (CG); D-F: cáncer gástrico (CG) frente a cáncer colorrectal (CCR); G-I: cáncer de esófago (CE) frente a cáncer colorrectal (CRC). A: miR-194/miR-145; B: miR-194/miR-148a; C: miR-194/miR-30e-3p; D: miR-155/miR-203; E: miR-145/miR-30e-3p; F: miR-203/miR-148a; G: miR-192/miR-145; H: miR-192/miR-148a; I: miR-192/miR-30e-3p.

Las figuras 19A-W son gráficos que muestran la comparación de diferentes razones de las concentraciones de miRNA en el plasma de todos los pacientes con enfermedades del aparato digestivo (GI) (enfermedad de Crohn y cánceres de esófago, gástrico y colorrectal) frente a pacientes con enfermedades del aparato respiratorio (asma, neumonía, EPOC, CPNM). A-U: una pareja de miRNA biomarcador/normalizador (A: miR-192/miR-126; B: miR-155/miR-126; C: miR-145/miR-126; D: miR-155/miR-30e-3p; E: miR-192/miR-30e-3p; F: miR-155/miR-409-3p; G: miR-486-5p/miR-17-5p; H: miR-155/miR-17-5p; I: miR-192/miR-17-5p; J: miR-146b-5p/miR-31; K: miR-155/miR-31; L: miR-192/miR-31; M: miR-486-5p/miR-155; N: miR-192/miR-155; O: miR-145/miR-155; P: miR-146b-5p/miR-155; Q: miR-486-5p/miR-203; R: miR-192/miR-203; S: miR-145/miR-203; T: miR-192/miR-215; U: miR-155/miR-215). V: un gráfico que muestra la comparación de las razones miR-486-5p/miR-155 y miR-145/miR-155 en el plasma de los pacientes con todas las enfermedades del aparato digestivo frente a las enfermedades pulmonares. W: análisis de curva ROC (curva de eficacia diagnóstica) para la diferenciación entre los pacientes con enfermedades del aparato digestivo y enfermedades pulmonares mediante el uso de las parejas de miRNA presentadas en la figura V. Se

informa del área bajo la curva (ABC) ROC. La sensibilidad, especificidad y exactitud de cada pareja biomarcador/normalizador se calcula para el punto de «corte», que es la razón biomarcador/normalizador a la cual una muestra tiene la misma probabilidad de pertenecer al grupo de enfermedades del aparato digestivo o al de las pulmonares.

- 5 Las figuras 20A-H son gráficos que muestran la comparación de diferentes razones de concentraciones de miRNA en el plasma de todos los pacientes con enfermedades inflamatorias (asma, neumonía, EPOC y enfermedad de Crohn) frente a los pacientes con cáncer (cánceres de esófago, gástrico, colorrectal y de pulmón no microcítico). A-F: una pareja de miRNA biomarcador/normalizador (A: miR-17-5p/miR-155; B: miR-192/miR-155; C: miR-215/miR-155; D: miR-192/miR-30e-3p; E: miR-155/miR-30e-3p; F: miR-146b-5p/miR-30e-3p. G: un gráfico que muestra la comparación de las razones miR-146b-5p/miR-155 y miR-146b-5p/miR-30e-3p en el plasma de pacientes con todas las enfermedades inflamatorias frente a todos los cánceres. H: análisis de curvas ROC (curvas de eficacia diagnóstica) para la diferenciación entre los pacientes con cánceres y con enfermedades inflamatorias mediante el uso de las parejas de miRNA presentadas en la figura G. Se informa del área bajo la curva (ABC) ROC. La sensibilidad, especificidad y exactitud de cada pareja biomarcador/normalizador se calcula para el punto de «corte», que es la razón biomarcador/normalizador a la cual una muestra tiene la misma probabilidad de pertenecer al grupo de pacientes con enfermedad inflamatoria o al de cáncer.

Las figuras 21A-B son diagramas de flujo que muestran los procedimientos de entrenamiento (A) y clasificación (B) de los biomarcadores para las enfermedades.

Descripción detallada de la invención

- 20 La presente invención se basa en la idea del cambio de paradigma en el campo de la detección y el diagnóstico clínicos a partir de las pruebas de detección específicas de la enfermedad hasta la una o varias pruebas de detección universal (PDU), que detectarán la enfermedad de un sistema de órganos determinado, tal como el aparato digestivo, el sistema nervioso, aparato circulatorio, etc., o de un órgano o tejido o tipo de célula concretos, pero no será específico de la enfermedad. Además, tal prueba será capaz de diferenciar algunos tipos amplios de procesos patológicos, p. ej., enfermedades inflamatorias y tumores. Una vez que se detecta la enfermedad, se pueden aplicar las pruebas específicas de la enfermedad para un diagnóstico más específico. Tales una o varias pruebas también se pueden utilizar para la detección selectiva de fármacos, así como para evaluar la toxicidad de diferentes compuestos y factores ambientales (p. ej., durante el desarrollo de los fármacos o los ensayos clínicos). La presente invención se basa en el uso de miRNA abundantes en sistema de órganos, en órgano, en tejido y/o en tipo de células que aparecen en los líquidos corporales como biomarcadores de la enfermedad del órgano y/o tejido y/o célula, la descripción de los fundamentos para tal selección de miRNA y los métodos de interpretación de la PDU. La PDU de la invención también puede incluir miRNA biomarcadores para algunos procesos patológicos generales, tales como, p. ej., hipoxia, inflamación, carcinogenia, etc.

- 35 La presente invención da a conocer un nuevo método no invasivo o mínimamente invasivo para la detección precoz, preferiblemente antes de la manifestación clínica, de los cambios patológicos (sin definir ninguna enfermedad específica) en un sistema de órganos o en un órgano/tejido/tipo de célula concretos en un sujeto, en donde dicho método comprende la determinación de la concentración de los miRNA abundantes en el sistema de órganos/órgano/tejido en un líquido corporal (p. ej., plasma, orina, saliva u otro líquido corporal) de dicho sujeto, en comparación con un control. Específicamente, el método comprende:

- 40 a. medir la concentración de los miRNA abundantes en diferentes sistemas de órganos/órganos/tejidos/tipos de células en una muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- b. medir la concentración de los miRNA normalizadores seleccionados previamente en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;
- c. calcular las razones de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b);
- 45 d. comparar las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (c) con las correspondientes razones de control, y
- e. (i) identificar que el sujeto está afectado por una enfermedad de un sistema de órganos/órgano/tejido/tipo de célula concreto cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho sistema de órganos por sus correspondientes miRNA normalizadores calculadas en la etapa (c) son más altas que las correspondientes razones de control, o (ii) identificar que el sujeto no está afectado por una enfermedad de dicho sistema de órganos/órgano/tejido/tipo de célula cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho sistema de órganos por sus correspondientes miRNA normalizadores calculadas en la etapa (c) no son más altas que las correspondientes razones de control.

- 55 Si da positivo para una enfermedad, tal PDU debe ir acompañada de pruebas específicas para diferentes enfermedades conocidas del sistema de órganos/órgano/tejido/tipo de célula identificado por la PDU.

La presente descripción también da a conocer los métodos para seleccionar los posibles miRNA biomarcadores. Para reflejar los cambios patológicos de un sistema de órganos, órgano, tejido o tipo de célula concretos, tales biomarcadores deben ser, primero, abundantes en uno de esos sistemas de órganos, órganos o tejidos y, segundo, su concentración en los líquidos corporales debe ser suficientemente alta para que se pueda detectar. Aunque en la actualidad no se hayan identificado todos los miRNA y no se conozcan los perfiles de expresión de órgano/tejido para muchos de ellos, los datos publicados (véase, p. ej., Hua et al. *BMC Genomics* 2009, 10: 214; Liang et al., *BMC Genomics*, 2007, 8: 166; Landgraf et al., *Cell*. 2007, 129: 1401-1414; Lee et al., *RNA*. 2008, 14: 35-42; <http://ferrolab.dmi.unict.it/miro/>; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir/>) son suficientes para formular los principales principios para la selección de los posibles biomarcadores:

1. Abundancia en el sistema de órganos/órgano/tejido/tipo de célula. Aunque algunos miRNA son muy abundantes en un determinado órgano o tejido, p. ej., miR-122 en el hígado y miR-124 en el cerebro, no se conoce ningún miRNA que sea específico al 100% de un órgano o tejido. Por supuesto, cuanto mayor es la abundancia del miRNA en un sistema de órganos/órgano/tejido/tipo de célula dado en comparación con los otros sistemas de órganos/órgano/tejidos/tipos de células, mayores posibilidades tendrá de convertirse en biomarcador. En la práctica, si la concentración de los miRNA en un órgano es al menos 4-5 veces más alta que en otros, se pueden seleccionar como posibles biomarcadores para la PDU. Para muchos órganos, tales miRNA se pueden encontrar en la bibliografía (véase, p. ej., Hua et al. *BMC Genomics* 2009, 10: 214; Liang et al., *BMC Genomics*. 2007; 8: 166; Landgraf et al., *Cell*. 2007, 129: 1401-1414; Lee et al., *RNA* 2008, 14: 35-42; <http://ferrolab-dmi.unict.it/miro/>; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir/>). La tabla 1 representa los miRNA abundantes en diferentes órganos de acuerdo con los numerosos datos publicados. Se puede ver que algunos miRNA son abundantes en diferentes órganos del mismo sistema de órganos. Esto es especialmente característico de los órganos digestivos, nerviosos, reproductores y circulatorios (tabla 2). El uso de estos miRNA permite diseñar una prueba que detectará la enfermedad en los sistemas, pero no en un órgano concreto. Al mismo tiempo, hay miRNA abundantes en uno o dos órganos de un sistema, y estos miRNA se pueden utilizar para pruebas que pueden definir la localización de la enfermedad de manera más precisa. La lista de estos miRNA se presenta en la tercera columna de la tabla 2. Hay también miRNA abundantes en dos o incluso más órganos, que normalmente se desarrollan durante la embriogénesis desde los mismos tipos de células. En tales casos, el incremento de la concentración de los miRNA en el líquido corporal no se puede interpretar sin ambigüedad. No obstante, este problema se resuelve con la combinación de varios miRNA abundantes en distintos conjuntos de órganos, y la presente invención también incluye un método computacional para el análisis de los datos obtenidos con varios miRNA. También es importante destacar que la abundancia de los miRNA en el segundo órgano no afectará de manera significativa a los resultados de la prueba, siempre que sea poco probable que estos miRNA aparezcan en los líquidos corporales. Por ejemplo, muchos miRNA son abundantes (además de en otros órganos) en la piel, pero si estos miRNA están localizados en la epidermis, la probabilidad de que aparezcan en el torrente circulatorio de la piel es muy baja y el método de la invención los utiliza.
2. Nivel de expresión del miRNA. El desarrollo de la prueba es más fácil y su sensibilidad es más alta si la concentración del posible o posibles miRNA biomarcadores en el sistema de órganos/órgano/tejido/tipo de célula deseado es suficientemente alta, ya que se puede esperar que aparezcan más moléculas de miRNA biomarcadores en los líquidos corporales. Así pues, si se puede elegir entre muchos miRNA biomarcadores posibles, se deben seleccionar los miRNA que no sólo son abundantes en la diana, sino que también se expresen mucho (p. ej., ≥ 1000 copias por célula). Esto es especialmente importante para los órganos pequeños o sus partes o tipos de células específicos dentro de los órganos, tales como los islotes pancreáticos de células β . Esto no significa que este miRNA que no se expresa mucho no se pueda utilizar para el desarrollo de la PDU, sino que la detección del miRNA expresado en poca cantidad podría necesitar un mayor volumen de los líquidos corporales y técnicas más sensibles para la cuantificación del miRNA. Al mismo tiempo, ya que la concentración del miRNA en un líquido corporal también depende de la eficacia de su secreción desde las células hacia un espacio extracelular y del transporte al líquido corporal (véase el siguiente apartado), para la selección experimental de los biomarcadores más prometedores se deben analizar tantos miRNA abundantes en el sistema de órganos/órgano/tejido/tipo de célula como sea posible.
3. Secreción del miRNA. Hay muchas maneras de que un miRNA acelular aparezca en los líquidos corporales (Hunter et al., *PLoS ONE*. 2008, 3: e3694; Wang et al., *Nucleic Acids Res.* 2010, 38: 7248-7259; Pigati et al., *PLoS ONE*. 2010, 5: e13515; Gupta et al., *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2010, 3: 484-488; Iguchi et al., *Commun. Integr. Biol.* 2010, 3: 478-481; Kosaka et al., *J. Biol. Chem.* 2010, 285: 17442-17452). Los miRNA pueden aparecer en el espacio extracelular y a continuación en los líquidos corporales como resultado de: (i) la muerte celular y la permeabilización de la membrana celular; (ii) la destrucción de algunos compartimientos celulares, tales como axones, dendritas y espinas de las neuronas; (iii) la exocitosis (Skog et al. *Nat. Cell. Biol.* 2008, 10: 1470-1476); (iv) la zeiosis (Charras et al., *Biophys J.* 2008, 94: 1836-1853; Fackler, Grosse, *J. Cell Biol.* 2008, 181: 879-884); (v) la secreción del miRNA libre o fijado a proteínas (Wang et al., *Nucleic Acids. Res.* 2010, 38: 7248-7259). El último mecanismo proporciona más del 50% del miRNA acelular en el medio extracelular desde las células vivas. La secreción de los miRNA es selectiva y las razones de diferentes concentraciones de los miRNA en las células y en el medio extracelular son diferentes. La

selectividad de la secreción de los miRNA es muy importante para seleccionar los posibles biomarcadores. Ya que no se han investigado los mecanismos de la secreción de miRNA desde las células normales y durante el desarrollo de enfermedades (Rabinowits et al. *Clin. Lung. Cancer*, 2009, 10: 42-46), es necesario analizar más miRNA, teniendo en cuenta que algunos de ellos, que parecen prometedores debido a su elevada expresión y a que abundan en un órgano/tejido deseado, se pueden secretar a una concentración baja y viceversa. Recientemente también se demostró que algunos miRNA, p. ej., miR-451 y miR-1246, que se secretan en muy poca cantidad desde las células normales, se pueden secretar con mucha más eficacia desde las células enfermas (Pigati et al. *PLoS ONE*, 2010, 5: e13515). Estos miRNA también se pueden analizar como posibles biomarcadores, aunque no sean muy abundantes en un sistema de órganos, órgano o tejido determinado, ya que su combinación con más miRNA específicos de órgano/tejido proporcionará más información útil para detectar una enfermedad.

Es importante recordar que aún no se han descubierto muchos miRNA y que no se ha analizado el perfil de expresión en diferentes tejidos de muchos miRNA descubiertos recientemente. Además, en muchos órganos, tejidos y, en especial, tipos de células, no se ha analizado la expresión de los miRNA que ya se conocen. Así pues, aunque el desarrollo de la PDU se puede iniciar sobre la base de datos ya publicados para muchos órganos y tejidos, la búsqueda adicional de nuevos biomarcadores incrementará el valor informativo de la PDU. Primero, se debe analizar el perfil de expresión de todos los miRNA conocidos en diferentes sistemas de órganos/órganos/tejidos/tipos de células para definir nuevos miRNA abundantes en el sistema de órganos/órgano/tejido (p. ej., por RT-PCR, que actualmente es la técnica más sensible y la menos variable para la medición cuantitativa de los miRNA). Segundo, el perfil de expresión de cualquier miRNA nuevo recién descubierto se debe analizar tal y como está descrito más arriba. Tercero, como todos los órganos están compuestos por diferentes tipos de células, la expresión de los miRNA abundantes en determinados órganos se debe también analizar para averiguar el tipo de célula en el cual son abundantes estos miRNA. En la actualidad, la mejor técnica para tal estudio es la hibridación *in situ* (ISH, por su nombre en inglés). Tal información, disponible en la actualidad para diferentes miRNA, se ha incluido en las tablas 1 y 2. Por ejemplo, se incluye la información sobre los miRNA abundantes en las células β pancreáticas, además de los miRNA abundantes en el páncreas, así como la abundancia de algunos miRNA en las neuronas localizadas en diferentes regiones del encéfalo.

Tabla 1. miRNA abundantes en diferentes órganos y tejidos humanos

Órgano/tejido/célula	miRNA abundante en el órgano/tejido
Corazón	1, 22, 30a-3p, 30e-3p, 133a, 133b, 197, 208a, 208b, 221, 222, 302a, 302c, 367, 378, 499-5p, 30e*
Musculoesquelético	1, 22, 95, 133a, 133b, 140, 206
Pulmón	15b, 18b, 21, 34b, 126, 135b, 142-3p, 142-5p, 146, 146b-5p, 155, 199b-5p, 200c, 205, 211, 223, 224, 302b, 375, 449a, 449b, 450b-5p, 486, 492, 522, 566, 574-3p, 620, 650, 766, 886-5p
Tráquea	34b, 135b, 146, 146b, 147b, 155, 199b-5p, 200b, 200c, 205, 219-5p, 223, 302b, 375
Hígado	30e-3p, 122a, 130b, 136, 148a, 194, 376c, 455-3p, 518b, 616, 801, 885-5p, 17*, 30d*, 194*
Riñón	10a, 10b, 30a-3p, 30c, 107, 135a, 135b, 184, 187, 190, 194, 196b, 200a, 204, 211, 324-5p, 489, 500, 501-5p, 502-3p, 502-5p, 503, 506, 508-3p, 508-5p, 509-3p, 509-5p, 510, 532-5p, 768-3p, 886-3p, 886-5p, 891a, 10b*, 30a*, 30c-2*, 30e*, 200a*, 200b*, 424*, 500*.
Vejiga	Let-7g, 18, 23b, 26a, 26b, 27b, 28, 106b, 143, 145, 152, 218, 221, 223, 296, 374, 422b, 451
Adiposo	10b, 30, 99a, 139-3p, 139-5p, 193a-5p, 196a, 224, 335, 365, 378/378*, 422b, 494, 518d-3p, 642a-3p, 708, 10b*, 335*
Mama	let-7a, 10b, 26a, 30a-3p, 30a-5p, 125b, 126, 145, 146, 195, 196a-2, 196b, 205, 206, 335, 339-5p, 378, 516-5p, 517c, 519c, 520g, 520h, 525, 1246

ES 2 630 602 T3

Órgano/tejido/célula	miRNA abundante en el órgano/tejido
Ovario	Let-7a, let-7b, let-7c, 10b, 17-3p, 26a, 100, 125a, 125b, 127, 195, 199a-5p, 202, 214, 298, 382, 503, 672, 741, 742, 883-3p, 199a*, 202*
Trompas de Falopio	10a, 10b, 31, 34b, 34c, 135a, 135b, 424, 449
Útero	Let-7c, 10b, 26a, 99a, 100, 125a-5p, 125b, 130a, 140, 143, 145, 195, 196b, 199b, 204, 214, 222, 939, 199*
Cuello uterino	Let-7a, let-7c, let-7g, 10b, 100, 101, 125a-5p, 125b, 130a, 134, 140, 143, 145, 186, 195, 196b, 197, 199a, 199b, 204, 214, 218, 222, 320, 424, 497, 154*, 199a*
Próstata	Let-7c, 1, 23b, 24, 27b, 28, 34a, 99a, 100, 125b, 130a, 143, 145, 147b, 187, 188-3p, 199b-5p, 205, 214, 222, 328, 373, 410, 455-5p, 490-3p
Testículo	15b, 34a, 34b, 34c, 127, 134, 135a, 135b, 187, 202, 204, 370, 372, 376a, 382, 424, 449, 465a-5p, 465b-5p, 506, 508, 509, 510, 514, 517a, 517c, 871-5p, 871-3p, 888, 202*, 888*
Sistema vascular	Familia de Let-7, 10a, agrupamiento 17-92 (17, 18a, 19a, 19b, 20a, 92), 21, 22, 23a, 24, 27a, 27b, 29a, 31, 34a, 98, 100, 106a, 126, 130a, 133a, 143, 145, 146a, 199a-3p, 210, 221, 222, 345, 365, 382, 409-3p, 431, 484, 495, 532-5p, 939, 27a*, 30a*, 30e*, 93*, 126*, 130b*, 222*
Bazo	15a, 15b, 126, 139, 142-3p, 142-5p, 146, 150, 155, 181a, 181b, 181d, 223, 302b, 342
Timo	15a, 15b, 17-5p, 20b, 106a, 106b, 142-3p, 142-5p, 146, 149, 150, 155, 181a, 181b, 181c, 182, 183, 205, 213, 342
Ganglios linfáticos	Let-7g, 15a, 20b, 21, 106b, 140, 142-3p, 146, 146b, 150, 181b, 181d, 342, 431
Linfocitos periféricos	Let-7g, 9, 15a, 15b, 17, 19b, 20a, 31, 106a, 124a, 124b, 128a, 137, 142-3p, 146b-5p, 150, 186, 191, 197, 222, 223, 328, 342-3p, 423, 431, 454, 484, 766, 27*, 223*
Linfocitos T	142-3p, 146a, 155, 181a, 205, 223, 424
Linfocitos B	142, 150, 342
Tiroides	Let-7i, 1, 7, 135a, 135b, 206, 345
Glándula suprarrenal	Let-7g, 7, 15a, 26b, 27a, 99b, 124, 127, 132, 134, 137, 139, 152, 181a, 187, 195, 192, 202, 299, 302b, 323, 324-3p, 324-5p, 328, 330-3p, 331, 335, 340, 365, 369-3p, 375, 379, 382, 409-5p, 429, 431, 432, 455-5p, 483-5p, 514, 126*, 182*, 202*
Páncreas	7, 18a, 21, 29a, 34a, 103, 127-3p, 129-3p, 130b, 134, 135a, 135b, 136, 141, 148a, 182, 183, 184, 192, 193a-3p, 193a-5p, 195, 199a-3p, 199a-5p, 200b, 200c, 204, 216a, 216b, 217, 224, 340, 365, 367, 374a, 374b, 375, 376a, 376c, 379, 382, 383, 429, 432, 451, 455-5p, 485-5p, 487b, 497, 539, 543, 642, 758, 939, 130b*, 136*, 183*, 200b*, 493*
Células β pancreáticas	7, 9, 21, 127-3p, 130b, 184, 195, 216a, 216b, 217, 376a, 376c, 497, 939, 493*
Intestino grueso (colon)	31, 141, 143, 145, 147b, 192, 194, 200a, 200b, 200bN, 200c, 200cN, 215, 219-2-3p, 321, 375, 378, 422a, 429, 450b-5p, 487a, 490-3p, 492, 504, 565, 574-3p, 622, 650, 801, 143*, 200b*
Intestino delgado	31, 141, 143, 192, 194, 200a, 200b, 200bN, 200c, 200cN, 215, 321, 375, 429

Órgano/tejido/célula	miRNA abundante en el órgano/tejido
Esófago	31, 106a, 106b, 143, 145, 148a, 203, 205, 210, 211, 221
Estómago	7, 26a, 26b, 29c, 31, 106a, 106b, 124b, 130b, 141, 145, 148a, 182, 188, 192, 197, 203, 375, 650
Cerebro	Let-7a, 7, 9, 96, 98, 99a, 103, 107, 124a, 125a, 125b, 127, 128a, 132, 134, 135a, 137, 138, 149, 153, 154, 181a, 181b, 181c, 182, 183, 184, 204, 211, 212, 213, 218, 219, 221, 222, 299-3p, 299-5p, 323-3p, 324-5p, 328, 329, 330, 331, 335, 337, 338, 342, 346, 369-3p, 369-5p, 370, 379, 381, 382, 383, 409-3p, 411, 425, 432, 433-5p, 485-3p, 485-5p, 487b, 488, 491-5p, 494, 495, 496, 504, 539, 541, 543, 584, 656, 668, 758, 874, 889, 935, 939, 1193, 1197, 9*
Cerebro, abundante en sinapsis, axones, dendritas, espinas	7, 9, 98, 124a, 125a, 125b, 128a, 132, 134, 135a, 137, 138, 154, 182, 183, 213, 218, 323-3p, 329, 337, 369-3p, 369-5p, 370, 381, 382, 409-3p, 425, 433-5p, 483-3p, 485-5p, 487b, 494, 495, 496, 541, 543, 656, 668, 874, 889, 935, 939, 9*
Corteza	9, 124a, 125a, 125b, 128a, 132, 134, 181c, 212, 213, 222, 330-3p, 338-5p, 342, 381, 382, 425, 433, 491-5p
Hipocampo	9, 96, 99a, 103, 124a, 125b, 128a, 132, 134, 137, 138, 181a, 181b, 212, 219, 221, 222, 324-5p, 328, 330, 331, 335-5p, 338, 369-3p, 381, 382, 383, 425, 433-5p, 485-5p, 491-5p
Hipotálamo	7, 124a, 128a, 132, 212
Cerebelo	9, 103, 124a, 125b, 128, 132, 134, 137, 138, 181a, 181b, 181c, 204, 212, 213, 218, 338, 381, 382, 425, 432, 489
Amígdala	103, 134, 138, 182, 183, 222, 323-3p, 369, 381, 382
Médula espinal	218, 219, 338, 451, 486
Hipófisis	7, 132, 212, 213, 328

Se pueden hacer varios niveles o generaciones de PDU. El primero se puede desarrollar para los sistemas del cuerpo humano (aparato digestivo, aparato genitourinario, cerebro, aparato circulatorio, etc.). El siguiente nivel de pruebas se puede centrar en órganos, tejidos, tipos de células, etc. Según las necesidades clínicas y las ventajas económicas, hay al menos dos versiones posibles de PDU y de sus aplicaciones prácticas: (i) primero, se puede realizar la PDU para los sistemas del cuerpo humano y a continuación, si se ha detectado una enfermedad en uno o varios sistemas, se realizarán las pruebas para los órganos/tejidos de esos sistemas; (ii) segundo, la PDU de órgano/tejido/tipo de célula se puede aplicar directamente con propósitos de detección.

Todos los órganos y tejidos consisten en varios tipos de células con diferentes origen, función y posibles enfermedades. Aunque la presente invención se centra principalmente en el nivel de los órganos y tejidos, y sus sistemas, se puede utilizar la misma estrategia para desarrollar una PDU que cubra diferentes tipos de células, cuando se dispone de suficiente información sobre los perfiles de expresión de los miRNA en diferentes tipos de células. En la actualidad, se ha obtenido tal información para las células β pancreáticas (tablas 1 y 2), lo que hace factible que la PDU incluya los miRNA abundantes en las células β , por ejemplo, para la detección precoz de la diabetes de tipo 1. Los miRNA marcadores para los linfocitos B y T también están disponibles y su inclusión en la PDU ayudará a la detección precoz de las enfermedades en las que intervienen estos tipos de células.

Tabla 2. miRNA abundantes en los sistemas de órganos y solo en determinados órganos

Sistemas del cuerpo humano	miRNA biomarcadores	Abundante en el órgano
Aparato respiratorio	34b, 135b, 146, 146b-5p, 155, 199b-5p, 200c, 205, 223, 302b, 375	Pulmón: 15b, 18b, 21, 126, 142-3p, 142-5p, 224, 449a, 449b, 450b-5p, 486, 492, 522, 566, 574-3p, 650, 766, 886-5p Tráquea: 147b, 200b, 219-5p
Aparato digestivo (Gastrointestinal)	31, 130b, 136, 141, 143, 145, 148a, 192, 203, 215, 375, 376c, 429, 455-5p, 650	Esófago: 106a, 106b, 205, 210, 221 Estómago: 7, 26a, 26b, 26c, 106a, 106b, 124b, 182, 188, 197 Intestino delgado: 194, 200a, 200b, 200c, 321 Intestino grueso: 147b, 194, 200a, 200b, 200c, 219-3p, 378, 450-5p, 487a, 490-3p, 492, 504, 565, 574-3p, 622, 801, 143*, 200b* Hígado: 122a, 194, 518b, 616, 801, 885-5p, 17*, 30d*, 194* Páncreas: 7, 18a, 21, 29a, 34a, 103, 127-3p, 129-3p, 134, 135a, 135b, 182, 183, 184, 193a-3p, 193a-5p, 195, 199a-3p, 199a-5p, 200b, 200c, 204, 216a, 216b, 217, 224, 340, 365, 367, 374a, 374b, 376a, 379, 382, 383, 432, 451, 485-5p, 487b, 497, 539, 543, 642, 758, 939, 130b*, 136*, 183*, 200b*, 493*
Aparato locomotor	1, 22, 95, 133a, 133b, 140, 206	
Sistema nervioso	Let-7a, 7, 9, 124a, 125a, 125b, 128a, 132, 134, 135a, 137, 138, 181a, 181c, 182, 184, 211, 212, 213, 218, 219, 222, 323-3p, 338-5p, 369, 381, 382, 425, 433-5p, 485-5p, 491-5p, 539, 541, 543, 656, 874, 935, 9*	Corteza: 330-3p, 342 Hipocampo: 96, 99a, 103, 181b, 221, 324-5p, 328, 330, 331, 335-5p, 383 Hipotálamo: no se ha hallado ningún miRNA específico Cerebelo: 103, 181b, 204, 432, 489 Amígdala: 103, 183 Médula espinal: 451, 486 Hipófisis: 328
miRNA, abundante en sinapsis, axones, dendritas, espinas	7, 9, 98, 124a, 125a, 125b, 128a, 132, 134, 135a, 137, 138, 154, 182, 183, 213, 218, 323-3p, 329, 337, 369-3p, 369-5p, 370, 381, 382, 409-3p, 425, 433-5p, 483-3p, 485-5p, 487b, 494, 495, 496, 541, 543, 656, 668, 874, 889, 935, 939, 9*	
Aparato circulatorio (cardiovascular)	22, 133a, 221, 222, 30e*	Corazón: 1, 30a-3p, 30e-3p, 133b, 197, 208a, 208b, 302a, 302c, 367, 378, 499-5p Sistema vascular: Let-7, 10a, 17, 18a, 19a, 19b, 20a, 21, 23a, 24, 27a, 27b, 29a, 31, 34a, 92, 98, 100, 106a, 126, 130a, 143, 145, 146a, 199a-3p, 210, 345, 365, 382, 409-3p, 431, 484, 495, 532-5p, 939, 27a*, 30a*, 93*, 126*, 130b*, 222*
Aparato urinario	No se ha encontrado ningún miRNA abundante ni en el riñón ni en la vejiga	

Sistemas del cuerpo humano	miRNA biomarcadores	Abundante en el órgano
Aparato reproductor (femenino)	Let-7a, Let-7c, 10b, 26a, 100, 125a, 125b, 130a, 140, 143, 145, 195, 196b, 199a, 199b, 204, 214, 222, 424, 517c, 199a*	Trompas de Falopio: 10a, 31, 34b, 34c, 135a, 135b, 449 Ovario: Let-7b, 127, 202, 298, 382, 503, 672, 741, 742, 883-3p, 202* Útero: 99a, 939 Cuello uterino: Let-7g, 101, 134, 186, 197, 218, 320, 497, 154* Mama: 126, 146, 205, 206, 335, 339-5p, 378, 516-5p, 519c, 520g, 520h, 525, 1246
Sistema endocrino	7, 127, 493*	Tiroides: Let-7i, 1, 135a, 135b, 206, 345 Glándula suprarrenal: Let-7g, 15a, 26b, 27a, 99b, 124, 132, 134, 137, 139, 152, 181a, 187, 195, 192, 202, 299, 302b, 323, 324-3p, 324-5p, 328, 330-3p, 331, 335, 340, 365, 369-3p, 375, 379, 382, 409-5p, 429, 431, 432, 455-5p, 483-5p, 514, 126*, 182*, 202* Células β pancreáticas: 9, 21, 130b, 184, 195, 216a, 216b, 217, 376a, 376c, 497, 939
Aparato circulatorio	15a, 15b, 142-3p, 142-5p, 146, 150, 181a, 181b, 181d, 205, 342, 423	Bazo: 126, 139, 155, 223, 302b Timo: 17-5p, 20b, 106a, 106b, 149, 155, 181c, 182, 183, 213 Ganglios linfáticos: Let-7g, 20b, 21, 106b, 140, 146b, 431 Células mononucleares periféricas: Let-7g, 9, 17, 19b, 20a, 31, 106a, 124a, 124b, 128a, 137, 186, 191, 197, 222, 223, 328, 431, 454, 484, 766, 27*, 223* Linfocitos T: 155, 223, 424 Linfocitos B: no se ha encontrado ningún miRNA específico

Aunque la presente invención se centra en el desarrollo de la PDU y su uso para la detección precoz de enfermedades con independencia de su naturaleza, pero específicas de un determinado sistema órganos, órgano, tejido y/o tipo de célula, tal o tales pruebas también pueden incluir miRNA biomarcadores, cuyo incremento de la expresión es característico de las enfermedades generales más frecuentes, tales como hipoxia, inflamación y cáncer (tabla 3). Se espera que se describan pronto muchos más posibles miRNA biomarcadores para estas enfermedades.

Tabla 3. Lista de miRNA cuyos cambios de concentración son característicos de enfermedades amplias

miRNA	Enfermedad*
Familia Let-7	Cáncer
10b	Cáncer
Familia 17-92	Cáncer

miRNA	Enfermedad*
21	Cáncer, inflamación
29a	Cáncer
31	Cáncer, inflamación
34a	Cáncer, inflamación
106a,b	Cáncer
125a-5p	Inflamación
125b	Inflamación
126	Cáncer, inflamación
146a,b	Cáncer, inflamación
150	Inflamación
155	Cáncer, inflamación
184	Cáncer
195	Cáncer
Familia 200/141	Cáncer
210	Cáncer
221	Inflamación
222	Inflamación
223	Inflamación
270	Hipoxia
373	Cáncer, hipoxia
375	Cáncer
423-5p	Cáncer
424	Hipoxia
451	Cáncer
486	Cáncer

***Referencias:**

1. Osada H., Takahashi T., Carcinogenesis 2007, 28, 2-12.
2. Schöler N. et al., Exptl. Hematology 2010, 38, 1126-1130.
3. Ma L., Weinberg RA., Trends in Genetics, 2008, 24, 448-456.
4. Esquela-Kerscher A, Slack FJ, Nature Rev. Cancer, 2006, 6, 259-269.
5. Krutovskikh VA, Herceg Z., Bioessays, 2010, 32, 894-904.
6. Wang Q. et al., Exptl. Biol. Med., 2012, [Epub Feb 16].
7. Oglesby IK et al., Respiratory Res., 2010, 11, 148.
8. Leidinger P. et al., Frontiers in Genetics, 2012, 2, 104.
9. Lujambio A, Lowe SW., Nature, 2012, 482, 347-355.
10. Yu D.-C., et al., Int. J. Mol. Sci., 2012, 12, 2055-2063.

En las tablas que aparecen a continuación se recogen los diferentes miRNA biomarcadores y normalizadores de utilidad que se describen en los ejemplos que vienen más adelante:

5 Tabla 4: parejas biomarcador/normalizador para TCL/EA

Número	Biomarcador	Normalizadores
1	miR-128	miR-9, miR-181a, miR-491-5p, miR-141
2	miR-132	miR-9, miR-181a, miR-491-5p, miR-141
3	miR-874	miR-9, miR-181a, miR-491-5p, miR-141
4	miR-134	miR-127, miR-370
5	miR-323-3p	miR-127, miR-370
6	miR-382	miR-127, miR-370
7	Todos los miRNA biomarcadores	Media de varios o todos los miRNA normalizadores

Tabla 5: parejas biomarcador/normalizador para enfermedades pulmonares

Número	Biomarcador	Normalizadores
1	miR-34b	miR-142-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-223, miR-409-3p
2	miR-486-5p	miR-142-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-223, miR-409-3p
3	miR-192	miR-142-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-223, miR-409-3p

10 Tabla 6: parejas biomarcador/normalizador para diferenciar entre el CPNM y las enfermedades pulmonares inflamatorias

Número	Biomarcador	Normalizadores
1	miR-34b	miR-155
2	miR-486b-5p	miR-146b-5p

Número	Biomarcador	Normalizadores
3	miR-192	miR-146b-5p

Tabla 7: parejas biomarcador/normalizador para las enfermedades digestivas

Número	Biomarcador	Normalizadores
1	miR-192	miR-30e-3p, miR-145, miR-148a
2	miR-194	miR-30e-3p, miR-145, miR-148a
3	miR-203	miR-30e-3p, miR-145, miR-148a
4	miR-215	miR-30e-3p, miR-145, miR-148a

Tabla 8: parejas biomarcador/normalizador para diferenciar entre la enfermedad de Crohn y los cánceres digestivos

Número	Biomarcador	Normalizadores
1	miR-215	miR-30e-3p, miR-194, miR-203
2	miR-203	miR-148a
3	miR-194	miR-148a, miR-192
4	miR-192	miR-203

5

Tabla 9: parejas de miRNA cuya razón diferencia entre los cánceres de diferentes órganos digestivos

Número	Cánceres comparados	Parejas de miRNA
1	Esofágico frente a gástrico	miR-194/miR-145, miR-194/miR-148a, miR-194/miR-30e-3p
2	Gástrico frente a colorrectal	miR-215/miR-203, miR-203/miR-30e-3p, miR-203/miR-148a
3	Esofágico frente a colorrectal	miR-192/miR-145, miR-192/miR-148a, miR-192/miR-30e-3p

Tabla 10: parejas de miRNA cuya razón diferencia entre las enfermedades de los aparatos respiratorio y digestivo

Número	Parejas de miRNA
1	miR-192/miR-126
2	miR-155/miR-126
3	miR-145/miR-126
4	miR-155/miR-30e-3p

Número	Parejas de miRNA
5	miR-192/miR-30e-3p
6	miR-155/miR-409-3p
7	miR-486-5p/miR-17-5p
8	miR-155/miR-17-5p
9	miR-192/miR-17-5p
10	miR-146b-5p/miR-31
11	miR-155/miR-31
12	miR-192/miR-31
13	miR-486-5p/miR-155
14	miR-192/miR-155
15	miR-145/miR-155
16	miR-146b-5p/miR-155
17	miR-486-5p/miR-203
18	miR-192/miR-203
19	miR-145/miR-203
20	miR-192/miR-215
21	miR-155/miR-215

Tabla 11: parejas de miRNA cuya razón diferencia entre las enfermedades inflamatorias y los cánceres de los aparatos respiratorio y digestivo

Número	Parejas de miRNA
1	miR-17-5p/miR-155
2	miR-192/miR-155
3	miR-215/miR-155
4	miR-192/miR-30e-3p
5	miR-155/miR-30e-3p
6	miR-146b-5p/miR-30e-3p

Los ejemplos de métodos útiles para medir la concentración de los miRNA en los líquidos corporales incluyen la hibridación con sondas selectivas (p. ej., mediante transferencia de tipo Northern, citometría de flujo basada en perlas, *microchips* [micromatrices] de oligonucleótidos o ensayos de hibridación en solución, tal como el kit de detección de miRNA mirVana de Ambion), detección basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la retrotranscripción de horquillas [RT-PCR], método matricial basado en la RT-PCR cuantitativa [matriz de qPCR]), o secuenciación directa mediante una de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (p. ej., secuenciación de ARN pequeño de Helicos, BeadArray para miRNA (Illumina), Roche 454 (FLX-Titanium) y ABI SOLiD). Para una revisión de otras técnicas que se pueden aplicar, véase, p. ej., Chen et al., *BMC Genomics*, 2009, 10: 407; Kong et al., *J Cell Physiol.* 2009; 218: 22-25. Ya que muchos miRNA específicos de tejidos/órganos están presentes en los líquidos corporales a una concentración mucho más baja que el miRNA ubicuo, y que una prueba de detección debe proporcionar la detección precoz de los cambios asociados a la enfermedad, que pueden ser relativamente bajos, es importante utilizar, al menos en la etapa de demostración preliminar, la técnica más sensible, y que menos varíe, para medir las concentraciones de los miRNA. En la presente invención, se utilizó a lo largo del estudio la RT-PCR, que detecta cantidades mayores de miRNA en el plasma y que es significativamente más robusta que las diferentes técnicas de matrices. Esto no excluye el uso de otras técnicas de análisis de miRNA en una prueba clínica resultante.

En algunas realizaciones, los miRNA se purifican antes de la cuantificación. Los miRNA se pueden aislar y purificar de los líquidos corporales mediante diferentes métodos, que incluyen el uso de kits comerciales (p. ej., kit miRNeasy [Qiagen], kit de aislamiento de ARN MirVana [Ambion/ABI], miRACLE [Agilent], kit de aislamiento de miRNA High Pure [Roche] y kit de purificación de miRNA [Norgen Biotek Corp.]), extracción con Trizol (véase el ejemplo 1 que aparecerá más adelante), concentración y purificación en intercambiadores de aniones, perlas magnéticas recubiertas con sustancias que se fijan al ARN, o absorción de determinados miRNA sobre oligonucleótidos complementarios.

En algunas realizaciones, se reduce o se elimina la degradación de los miRNA de las muestras de líquidos corporales y/o durante la purificación de los ARN pequeños. Los métodos útiles para reducir o eliminar la degradación de los miRNA incluyen, sin limitación, la adición de inhibidores de las ARNasas (p. ej., Rnasin Plus [Promega], SUPERase-In [ABI], etc.), uso del cloruro de guanidina, isotiocianato de guanidina, *N*-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de sodio (SDS), o una combinación de los mismos. De igual forma, cuando se trabaja con muestras de orina, se puede conseguir un riesgo más bajo de degradación del miRNA cuando la muestra se ha mantenido en la vejiga durante un tiempo más breve (p. ej., menos de 4 horas). La reducción de la degradación de los miRNA en las muestras de líquidos corporales es particularmente importante cuando se requiere el almacenamiento y el transporte de las muestras antes de cuantificar el miRNA.

La presente descripción también da a conocer varias estrategias para la normalización de la concentración de los miRNA detectados en los líquidos corporales. Se podrán emplear en la presente invención diversos métodos de normalización de datos experimentales para explicar las posibles pérdidas de un miRNA dado durante la purificación, la posible inhibición de la RT-PCR, los miRNA contaminantes procedentes de células muertas o dañadas de la sangre o de la orina durante el aislamiento y el tratamiento de la muestra, variaciones de la filtración de los riñones, etc. Por ejemplo, en la presente invención se pueden utilizar uno o varios de los siguientes métodos de normalización:

a) Se pueden sintetizar oligonucleótidos de miRNA sintéticos (p. ej., miRNA ausente en las células humanas) y utilizarlos como controles para las pérdidas durante la purificación y la inhibición de la RT-PCR (al añadirlos a las muestras de líquidos corporales antes de la purificación de los miRNA).

b) La concentración de un miRNA deseado se puede normalizar por uno de los miRNA ubicuos (p. ej., miR-16, miR-30e, miR-103 y otros), por los ARN nucleolares pequeños (snoRNA), o por el ARN nuclear pequeño U6 (U6 snRNA).

c) Otra estrategia se basa en la normalización de la concentración de los miRNA deseados que se expresan en numerosos tejidos, pero no en uno deseado. Por ejemplo, el miR-10a y el miR-141 se expresan en el cerebro en mucha menor cantidad que en otros órganos, y el miR-409-3p se expresa en el pulmón en una cantidad mucho más baja que en otros tejidos. Esta estrategia disminuye la posibilidad de que un miRNA normalizador cambie debido a una enfermedad concreta.

d) La concentración de un miRNA deseado también se puede normalizar por un miRNA de otros órganos (p. ej., el miRNA abundante en el corazón se puede normalizar por el miRNA abundante en el colon o en el cerebro, y viceversa).

e) La normalización de un miRNA deseado por otro miRNA abundante en el mismo órgano, tejido o sistema de órganos puede ser eficaz si un el miRNA biomarcador y el miRNA normalizador se expresan en diferentes tipos de células o en diferentes órganos del mismo sistema.

f) La normalización de un miRNA deseado por otro miRNA del mismo órgano o tejido si su expresión y/o secreción se ven afectadas de manera diferente por una enfermedad.

g) La normalización de un miRNA deseado por un miRNA abundante en el tejido es útil cuando, por ejemplo, los cambios de la expresión y/o secreción de un miRNA deseado son característicos de una enfermedad concreta (cáncer, inflamación, etc.), pero el miRNA no es abundante en el órgano/tejido de interés. En tal caso, la normalización por un miRNA abundante en el tejido será de ayuda para relacionar una enfermedad con un determinado órgano o sistema de órganos.

h) La normalización por la media de varios miRNA normalizadores o, si se analizan muchos miRNA, p. ej., más de 15, la normalización por la media de todos los miRNA analizados.

i) Para explicar las variaciones de filtración del riñón (cuando se trabaja con las muestras de orina), la concentración del miRNA en la orina se puede normalizar por la concentración de creatinina y/o albúmina.

El cálculo de la normalización junto con el procesamiento adicional de los datos se puede realizar mediante el programa informático de la PDU, que consiste en tres partes:

- Sistema de gestión de bases de datos (SGBD) utilizado para acceder y mantener la K-base y la I-base. Puede ser uno de los sistemas estándares de la industria, como, pero sin limitarse a ellos, SQL Server, Oracle, MySQL, etc.

- Aplicación para el desarrollo de pruebas de detección a utilizar en la etapa de investigación. Las funciones de esta aplicación incluyen la selección del miRNA adecuado y la construcción de conjuntos de datos, creación de conjuntos de enfermedades, etc. La aplicación es de tipo escritorio e incluye: (i) interfaz de usuario para introducir/inspeccionar datos en la K-base y en la I-base, y para controlar la ejecución de los algoritmos; (ii) procesamiento de los datos para el aprendizaje y la clasificación en la etapa de desarrollo; (iii) programas de servicio para comprobar la coherencia de los conjuntos de datos, etc.; (iv) archivos de órdenes para la creación/verificación/modificación de las tablas de la K-base y de la I-base. El algoritmo para el procesamiento de datos (algoritmo 1) incluye las partes de aprendizaje y clasificación.

- Aplicación para el procesamiento de las pruebas de detección en el uso clínico de la PDU. Las funciones de esta aplicación incluyen el entrenamiento con una gran cantidad de datos y la clasificación sobre los datos reales de las pruebas de detección. La aplicación puede ser de tipo escritorio, o una aplicación web, e incluye: (i) interfaz de usuario para introducir/inspeccionar los datos de la I-base y para controlar la ejecución de los algoritmos; (ii) procesamiento de los datos para el aprendizaje y/o la clasificación de los datos del sujeto; (iii) archivos de órdenes para la creación/verificación/modificación de las tablas de la K-base y de la I-base; estas tablas son diferentes de las de la aplicación para el desarrollo de pruebas de detección. El algoritmo para el procesamiento de los datos (algoritmo 2), al igual que el algoritmo 1, incluye el aprendizaje y la clasificación, que podrán ser diferentes a los del algoritmo 1.

Tal y como se explica en detalle a continuación en los ejemplos, la estrategia propuesta se validó mediante el análisis de los miRNA del plasma de pacientes con diferentes enfermedades de varios órganos.

1. Sistema nervioso:

- a) Trastorno cognitivo leve (TCL);
- b) Enfermedad de Alzheimer (EA)

2. Aparato digestivo:

- a) Cáncer de esófago
- b) Cáncer gástrico
- c) Cáncer de colon
- d) Enfermedad de Crohn

3. Aparato respiratorio:

- a) Asma
- b) Neumonía
- c) Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)
- d) Cáncer de pulmón

Para la selección de los miRNA biomarcadores y normalizadores, se analizaron por RT-PCR las concentraciones en el plasma de muchos miRNA abundantes en los órganos y sistemas de órganos correspondientes. Los miRNA

ubicuos y los miRNA expresados en numerosos órganos, pero subexpresados en los órganos de interés, también se analizaron como posibles normalizadores. Se les comprobó a todos los miRNA analizados en sus correspondientes órganos o sistemas de órganos su potencialidad como biomarcadores y normalizadores, y se seleccionaron como las más prometedoras las combinaciones que proporcionaron una diferenciación estadísticamente significativa entre una enfermedad y los correspondientes controles.

Sistema nervioso

La detección precoz del trastorno cognitivo leve (TCL) y la enfermedad de Alzheimer (EA) se utilizó para validar la estrategia propuesta para el desarrollo de una prueba de detección para el sistema nervioso. La EA es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente, que comprende un gran grupo de enfermedades ocasionadas por cambios metabólicos de las células del cerebro, pérdida de sinapsis y otros compartimentos de las neuronas y, finalmente, la muerte neuronal (para una revisión, véase *Neurodegenerative Diseases: From Molecular Concepts to Therapeutic Targets*. Editores: R. von Bernhardi, N. C. Inestrosa, Nova Publishers, 2008). La EA se caracteriza por la retracción de los axones, defectos en el transporte por el axón, disfunción sináptica, pérdida de sinapsis y, finalmente, la muerte neuronal en varias zonas del cerebro específicas de la enfermedad, tales como el hipocampo y la corteza (véase, p. ej., Crews, Masliah, *Human Mol Gen.*, 2010, 19: R12-R20; Bredesen, *Molecular Neurodegeneration* 2009, 4: 27; Nimmrich y Ebert, *Rev. Neurosci.* 2009, 20: 1-12; Yoshiyama et al., *Neuron*. 2007, 53: 337-351; Wishart et al., *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 2006, 65: 733-739; Gyls et al., *Neurochem Int.* 2004, 44: 125-131; Conforti et al., *Trends Neurosci.* 2007. 30: 159-166; Revuelta et al. *Am J. Alzheimers Dis Other Dement* 2008, 23: 97-102).

La primera etapa sintomática de la EA que se manifiesta con síntomas clínicos leves es el TCL, que se suele definir como un estado intermedio entre el envejecimiento normal y la demencia (DeCarli, *Lancet Neurol.*, 2003, 2: 15-21; Stephan et al., *Alzheimer's Res Therapy*, 2009; 1: 1-9; Apostolova et al., *Human Brain Mapping*, 2010, 31: 786-797). El TCL es un síndrome heterogéneo que puede abocar en diferentes desenlaces. Hasta el 40% de los pacientes con un TCL revierten al estado normal (Larrieu et al., *Neurology*, 2002, 59: 1594-1599; Brooks, Loewenstein, *Alzheimer's Res Therapy*, 2010, 2: 28-36), y los estudios de autopsias demuestran que un porcentaje importante de pacientes con TCL no tienen indicios de EA (Jicha et al., *Arch Neurol.* 2006, 63: 674-681; Khan, Alkon, *Neurobiol. Aging*. 2010, 31: 889-900). Aproximadamente el 60% de los pacientes con TCL se convierten en demencia a un ritmo del 10% al 15% al año (Petersen et al., *Arch. Neurol.* 2001, 58: 1985-1992; Apostolova et al., *Human Brain Mapping*, 2010, 31: 786-797). Aunque la EA sea la causa más frecuente de demencia, a aproximadamente el 20% de los pacientes con TCL que progresan a demencia no se les diagnostica la EA, sino otras enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad vascular, cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y otras demencias (Jicha et al., *Arch Neurol.* 2006, 63: 674-681; Stephan et al., *Alzheimer's Res Therapy*, 2009, 1: 1-9).

Así pues, la detección del TCL y de la EA mediante el análisis de los miRNA en circulación apoya la idea de desarrollar una prueba específica del órgano/sistema para diferentes enfermedades. Tal y como se explica en detalle en los ejemplos, para la selección de miRNA biomarcadores y normalizadores se analizaron por RT-PCR la concentración de muchos miRNA abundantes en el cerebro, entre ellos los abundantes en axones y sinapsis, en el plasma de los pacientes con TCL y EA, y en el grupo de control emparejado por edades. Se comprobaron todos los miRNA seleccionados como posibles biomarcadores y normalizadores, y se identificó que las más prometedoras eran las combinaciones que proporcionaron una diferenciación estadísticamente significativa entre los pacientes con TCL y los controles emparejados por edades. Los datos han demostrado que los posibles biomarcadores más eficaces son los miRNA de los axones y las sinapsis, y que los normalizadores más eficaces son otros miRNA abundantes en el cerebro, aunque también se pueden utilizar otros miRNA para la normalización. Dos familias de biomarcadores, la familia de miR-132 y la familia de miR-134, y varios normalizadores han mostrado la sensibilidad (84%-92%) y la especificidad (84%-90%) más altas para la detección del TCL. La elevada correlación entre los miembros de la familia de miR-134 se puede explicar con facilidad por el hecho de que todos los miembros de esta familia, a saber miR-134, miR-323-3p y miR-382, pertenecen al mismo agrupamiento y se expresan en los mismos tipos de células. No se había descrito antes la estrecha relación entre los miembros de la familia de miR-132, a saber, miR-128, miR-132 y miR-874. También es interesante que las familias de biomarcadores de miR-132 y miR-134 producen los mejores resultados con diferentes normalizadores. La familia de miR-132 funciona mejor que la familia de miR-134 con los normalizadores miR-491-5p, miR-181a, miR-9 y miR-141. Por otra parte, la familia de miR-134 muestra mejores resultados que la familia de miR-132 con los normalizadores miR-370 y miR-127.

Así pues, el síndrome heterogéneo de TCL y la EA se pueden detectar mediante el análisis de los miRNA abundantes en el cerebro que circulan fuera de las células en el plasma.

Ya que en las diferentes enfermedades neurodegenerativas están implicadas diferentes regiones cerebrales que conducen al desarrollo de la demencia (Geldmacher y Whitehouse, *Neurology*. 1997, 48: S2-9, Levy y Chelune, *J. Geriatr Psychiatry Neurol.* 2007, 20: 227-238; Gong y Lippa, *Am J. Alzheimer's Dis Other Dement*, 2010, 25: 547-555) y debido a los diferentes perfiles de expresión de los miRNA en diferentes regiones cerebrales (Landgraf et al. *Cell*. 2007, 129: 1401-1414; *The miR-ontology Data Base*: <http://ferrolab.dmi.unict.it/micro>), el análisis de otro miRNA abundante en el cerebro sería útil para diferenciar los cambios y los procesos ocasionados por diferentes enfermedades neuronales en el cerebro.

Aparato digestivo

Las muestras de plasma de pacientes con cánceres en los estadios 1 y 2 de tres órganos digestivos (GI) (esófago, estómago y colon) y con la enfermedad de Crohn (una enfermedad inflamatoria del intestino que podría afectar a cualquier parte del tubo digestivo) se utilizaron para validar la estrategia propuesta para el desarrollo de una prueba de detección para el aparato digestivo. Se midió la concentración en el plasma de los miRNA abundantes en el aparato digestivo o en determinados órganos digestivos, p. ej., el miR-215, que es muy abundante en el colon y en el intestino delgado, y el miR-203, que es abundante en el esófago y en menor grado en el estómago, así como del ubicuo miR-30e-3p. Se calculó la razón de todas las posibles parejas de miRNA para encontrar las combinaciones biomarcador/normalizador más prometedoras. Los datos obtenidos han demostrado que miR-192, miR-194, miR-203 y miR-215 son los biomarcadores más eficaces, y que miR-145, miR-148a y miR-30e-3p son los normalizadores más eficaces. Las razones biomarcador/normalizador diferencian con eficacia entre los pacientes con todas las enfermedades estudiadas y los controles. El miR-203, que es muy abundante en el esófago y en el estómago, es especialmente eficaz a la hora de detectar un cáncer de estos órganos, y el miR-215, que es muy abundante en la columna, es más eficaz a la hora de diferenciar a los pacientes con el cáncer de colon y la enfermedad de Crohn de los controles. La combinación de dos o más razones biomarcador/normalizador se puede utilizar para incrementar la especificidad y la sensibilidad. Por ejemplo, los miR-192 y miR-203 normalizados por miR-30e-3p diferencian con eficacia entre los pacientes con todas las enfermedades del aparato digestivo y los controles, con una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100%. Es importante que todos los tumores analizados estén en el estadio 1 o 2, lo que significa que la estrategia propuesta puede utilizarse con eficacia para la detección y el diagnóstico precoz. A continuación, se compararon con mayor detalle las parejas de diferentes cánceres, así como la enfermedad de Crohn frente a todos los cánceres del aparato digestivo. Como resultado, se ha hallado que las siguientes razones biomarcador/normalizador son capaces de diferenciar enfermedades concretas:

1. Enfermedad de Crohn frente a los cánceres de esófago, gástrico y colorrectal: miR-194/miR-148; miR-215/miR-30e-3p; miR-215/miR-194; miR-203/miR-148a; miR-192/miR-203; miR-215/miR-203 y miR-194/miR-192.
2. Cáncer de esófago frente a cáncer gástrico: miR-194/miR-145; miR-194/miR-148a; miR-194/miR-30e-3p.
3. Cáncer de esófago frente a cáncer colorrectal: miR-192/miR-145; miR-192/miR-148a; miR-192/miR-30e-3p.
4. Cáncer gástrico frente a cáncer colorrectal: miR-203/30e-3p; miR-203/miR-148a; miR-215/miR-203.

Así pues, el análisis de la concentración en el plasma que presentan los miRNA abundantes en los órganos del aparato digestivo es eficaz para: (i) la detección de los tumores y afecciones inflamatorias, tales como la enfermedad de Crohn, en el esófago, estómago y colon; (ii) la diferenciación entre una enfermedad inflamatoria y los cánceres; (iii) la diferenciación de los cánceres localizados en diferentes órganos del aparato digestivo.

Aparato respiratorio

Las muestras de plasma de pacientes con cuatro enfermedades, a saber, asma, neumonía, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM, estadios 1 a 4) se utilizaron para validar la estrategia propuesta para el desarrollo de una prueba de detección para el aparato respiratorio. Ya que los pacientes que participan con asma y neumonía eran no fumadores, y que los pacientes con EPOC y CPNM eran fumadores, las muestras de plasma también se recogieron de dos grupos de control bien diferenciados: fumadores y no fumadores. Se midió la concentración en el plasma de los miRNA abundantes en el pulmón y del miR-409-3p, que está presente en muchos órganos, pero que está subexpresado en el pulmón. De nuevo, tal y como se describe más arriba para el aparato digestivo, las razones de todas las posibles parejas de miRNA se calcularon para encontrar las combinaciones biomarcador/normalizador más prometedoras.

Se ha encontrado que miR-34b y miR-486-5p, que son muy abundantes en el pulmón, son biomarcadores eficaces que se normalizaron por miR-409-3p para diferenciar los pacientes con asma y neumonía de los controles no fumadores, y los pacientes con EPOC y CPNM de los controles fumadores. Otros normalizadores eficaces son miR-142-5p, miR-146b-5p, miR-155 y miR-223, abundantes en el pulmón, posiblemente debido a que están reprimidos en las enfermedades de pulmón (Liu X. et al., *Clin. Cancer Res.* 2009, 15: 1177-1183; Miko E. et al., *Exp. Lung Res.* 2009, 35: 646-664; Halappanavar S. et al. *Toxicology* 2011, 285: 133-141; Heegaard N. H. et al., *Int. J. Cancer*, 2012, 130: 1378-1386). De modo inesperado, el miR-192 también se comportó como un biomarcador eficaz para las enfermedades pulmonares. Ya que también se demostró que este miRNA era un biomarcador eficaz para las enfermedades del aparato digestivo, es razonable sugerir que la expresión y/o secreción de miR-192 se incrementa debido a la inflamación o a los procesos de desarrollo de los tumores (Benjamin H. et al., *J. Mol. Diagn.* 2010, 12: 771-779; Lan H. Y. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28 de diciembre de 2011 [Epub anterior a la versión impresa]; Luzna P. et al. *Diagn. Pathol.* 2011, 6: 114; Wu Q. et al. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, Epub, 26 de mayo; Zhou J. et al., *J. Clin. Oncol.* 2011, 29: 4781-4788).

Ya que las razones miRNA biomarcador / miRNA normalizador no eran diferentes para los controles de fumadores y de no fumadores, las cuatro enfermedades se compararon con los controles combinados (sujetos fumadores y no

fumadores). Los datos obtenidos demuestran que los pacientes con las cuatro enfermedades analizadas se pueden diferenciar con eficacia de tales controles combinados mediante diferentes conjuntos de miRNA biomarcadores y normalizadores, p. ej., miR-34b normalizado por miR-409-3p, miR-486-5p normalizado por miR-223, o miR-192 normalizado por miR-155. También había otros conjuntos eficaces de miRNA biomarcadores y normalizadores.

- 5 También se analizó la capacidad que tienen diferentes combinaciones de miRNA biomarcadores y normalizadores para diferenciar entre el CPNM y las enfermedades inflamatorias tales como asma, neumonía y EPOC. Los resultados demostraron que los pacientes con CPNM se diferenciaban con eficacia de los pacientes con enfermedades inflamatorias mediante el uso de las razones de miR-34b por miR-155, de miR-486-5p por miR-146b-5p o por miR-142-5p, de miR-192 por miR-146b-5p. Había otras combinaciones eficaces de miRNA biomarcadores y normalizadores.

Así pues, las enfermedades del aparato respiratorio se pueden detectar con eficacia mediante el análisis de los miRNA acelulares en circulación por el plasma, si los miRNA abundantes en el pulmón se utilizan como biomarcadores o normalizadores, o ambos. Algunas combinaciones de biomarcador/normalizador también pueden diferenciar con eficacia entre los pacientes con cáncer y los pacientes con enfermedades pulmonares inflamatorias.

15 Distinción de enfermedades en diferentes sistemas de órganos

Para validar la idea de que una prueba basada en el análisis de los líquidos corporales en busca de miRNA abundantes en un órgano es capaz de detectar los sujetos con una enfermedad de un determinado sistema de órganos, es necesario demostrar que hay combinaciones de miRNA capaces de diferenciar las enfermedades de diferentes sistemas de órganos. Tal y como se describe en detalle en los ejemplos, los miRNA se purificaron de las muestras de plasma obtenidas de los pacientes con enfermedades del aparato digestivo (enfermedad de Crohn y cáncer de esófago, gástrico y colorrectal) y del aparato respiratorio (asma, neumonía, EPOC y CPNM). Se analizó la concentración de los miRNA abundantes en el pulmón y abundantes en el aparato digestivo, así como varios miRNA, implicados en procesos patológicos de diferentes órganos. Además, en el estudio se incluyeron como posibles normalizadores los ubicuos miR-30e-3p y miR-409-3p. La concentración de cada miRNA se normalizó por miR-30e-3p y miR-409-3p, así como entre ellos, se convirtió en la cantidad relativa (CR) del miRNA de acuerdo con el protocolo de ABI ($2^{-\Delta Ct}$), y se compararon los perfiles característicos de los miRNA de los pacientes con las enfermedades de los aparatos respiratorio y digestivo. Los datos demostraron que muchas parejas de miRNA diferenciaban con eficacia los pacientes con enfermedades de los aparatos respiratorio y digestivo: miR-192/miR-126; miR-155/miR-126; miR-145/miR-126; miR-155/miR-30e-3p; miR-192/miR-30e-3p; miR-155/miR-409-3p; miR-486-5p/miR-17-5p; miR-155/miR-17-5p; miR-192/miR-17-5p; miR-146b-5p/miR-31; miR-155/miR-31; miR-192/miR-31; miR-486-5p/miR-155; miR-192/miR-155; miR-145/miR-155; miR-146b-5p/miR-155; 486-5p/miR-203; miR-192/miR-203; miR-145/miR-203; miR-192/miR-215; miR-155/miR-215. La combinación de dos parejas de miRNA incrementa la exactitud de la prueba. Por ejemplo, la combinación de las razones miR-145/miR-155 y miR-486-5p/miR-155 diferenció los pacientes con todas las enfermedades del aparato digestivo entre los pacientes con enfermedades pulmonares con una sensibilidad del 95%, especificidad del 90% y exactitud del 93%.

Distinción de diferentes enfermedades en distintos sistemas de órganos

Debido a los cambios característicos de la expresión y de la secreción de algunos miRNA durante las enfermedades inflamatorias y el desarrollo del cáncer en diferentes órganos, se planteó que el análisis de su concentración en los líquidos corporales se podría utilizar para diferenciar entre estas enfermedades. Se utilizaron las mismas muestras plasmáticas para la purificación de los miRNA y se analizaron los mismos miRNA que se describieron en el apartado anterior. En este estudio, se analizó la capacidad que tienen las diferentes combinaciones de miRNA para diferenciar entre los pacientes con enfermedades inflamatorias (asma, neumonía, EPOC y enfermedad de Crohn) y los pacientes con diferentes cánceres (de esófago, gástrico, colorrectal y pulmonar no microcítico). Los datos demuestran que varias parejas de miRNA diferencian con eficacia entre los pacientes con enfermedades inflamatorias y los pacientes con cáncer: miR-17-5p/miR-155; miR-192/miR-155; miR-215/miR-155; miR-146b-5p/miR-155; miR-192/miR-30e; miR-146b-5p/miR-30e-3p; miR-155/miR-30e-3p. Hay menos parejas de miRNA que diferencian entre las enfermedades inflamatorias y los cánceres que las parejas de miRNA capaces de diferenciar entre las enfermedades del aparato respiratorio y las enfermedades del aparato digestivo. Primero, los cambios de expresión de muchos miRNA son característicos de ambos tipos de enfermedad. Segundo, en muchos casos, la carcinogénesis viene acompañada por una inflamación relativamente prominente. La combinación de dos parejas de miRNA incrementa la exactitud de la prueba. Por ejemplo, la combinación de las razones miR-146b-5p/miR-155 y miR-146b-5p/miR-30e-3p distinguió todos los pacientes con enfermedades inflamatorias entre los pacientes con cáncer con una sensibilidad del 80%, especificidad del 98% y exactitud del 89%.

Así pues, los resultados de los experimentos presentados en la presente invención apoyan sus principales ideas. El análisis de la concentración en el plasma que presentan los miRNA abundantes en un sistema de órganos o en un órgano determinados, diferencia entre: (i) las enfermedades del sistema de órganos y los controles; (ii) las enfermedades de tres órganos del aparato digestivo; (iii) las enfermedades del aparato respiratorio y digestivo; (iv) los cánceres y las enfermedades inflamatorias.

Kits

Junto con los métodos diagnósticos y de detección de más arriba, la presente descripción da a conocer diferentes kits que comprenden uno o varios conjuntos de cebadores y/o sondas específicos para la detección del miRNA deseado. Tales kits pueden además incluir conjuntos de cebadores y/o sondas específicos para la detección del miRNA normalizador. Las combinaciones de cebadores o sondas de los kits se pueden basar, por ejemplo, en diferentes combinaciones de las moléculas recogidas en las tablas 1 a 11.

Tales kits pueden ser útiles para dirigir la detección de los miRNA en las muestras de líquidos corporales aislados de los pacientes o se pueden utilizar en las muestras de ARN purificado.

Un kit de la descripción también da a conocer reactantes para la extensión de cebadores y para las reacciones de amplificación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el kit podría además incluir uno o varios de los siguientes componentes: una enzima retrotranscriptasa, una enzima ADN polimerasa (tal como, p. ej., una ADN polimerasa termoestable), un tampón para la reacción en cadena de la polimerasa, un tampón para la retrotranscripción y trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTP). Como alternativa (o además), un kit puede incluir reactantes para realizar un ensayo de hibridación. Los agentes de detección pueden incluir análogos de nucleótidos y/o un resto de marcación, p. ej., un resto detectable directamente, tal como un fluoróforo (fluorocromo) o un isótopo radiactivo, o un resto detectable de forma indirecta, tal como un miembro de una pareja de fijación, tal como biotina, o una enzima capaz de catalizar una reacción colorimétrica o luminométrica insoluble. Además, el kit podría además incluir al menos un envase que contiene reactivos para detectar ácidos nucleicos en electroforesis. Tales reactivos incluyen los que detectan directamente ácidos nucleicos, tales como un agente intercalante fluorescente o reactivos de tinción con plata, o los reactivos encargados de detectar ácidos nucleicos marcados, tales como, pero sin limitarse a ellos, reactivos de ECL. Un kit puede además incluir medios de aislamiento o purificación de miRNA, así como controles negativos y positivos. Un kit también puede incluir una advertencia asociada a él en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de los kits para diagnóstico. También podrían venir con el kit las instrucciones detalladas para el uso, conservación y solución de problemas. Un kit también se puede dar a conocer opcionalmente en una carcasa adecuada que es preferiblemente útil para la manipulación robotizada en un contexto de altas prestaciones.

Los componentes del kit se podrían dar a conocer como polvos secos. Cuando los reactivos y/o componentes se dan a conocer como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir por la adición de un solvente idóneo. Se contempla que el solvente también se puede dar a conocer en otro envase. El envase incluirá por lo general al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringuilla y/u otros medios de contención en los que se coloca el solvente, opcionalmente distribuido en alícuotas. Los kits también podrían comprender un segundo envase que contenga un tampón farmacéuticamente aceptable y estéril y/u otro solvente.

Cuando hay más de un componente en el kit, el kit también contendrá por lo general un segundo, tercero o más envases adicionales dentro de los que se podrían colocar por separado los componentes adicionales. Sin embargo, diferentes combinaciones de componentes podrían estar comprendidos en un envase.

Tales kits también podrían incluir componentes que conservan o mantienen el ADN o el ARN, tales como reactantes que protegen de la degradación a los ácidos nucleicos. Tales componentes podrían estar, por ejemplo, libres de nucleasas o ARNasas, o proteger de las ARNasas. Cualquiera de las composiciones o reactantes descritos en la presente memoria podrían ser componentes en un kit.

Definiciones

El término «prueba de detección» se utiliza en la presente memoria para referirse a una prueba que se utiliza para la detección precoz de una enfermedad, preferiblemente antes de su manifestación clínica. En la presente memoria se describen principalmente dos tipos de pruebas de detección: (i) las pruebas de detección que detectan una enfermedad en un sistema de órganos/órgano/tejido/tipo de célula determinado, y (ii) las pruebas de detección que detectan cambios patológicos generales concretos, tales como, p. ej., hipoxia, inflamación o carcinogénesis, pero que no localizan esta enfermedad en un sistema de órganos/órgano/tejido/tipo de célula determinado. La terminología «prueba de detección universal (PDU)» se refiere a una o a las dos pruebas de detección mencionadas más arriba.

La terminología «sistema de órganos» se refiere a un grupo de órganos relacionados que trabajan juntos para desempeñar una determinada tarea. Por ejemplo, esófago, estómago, duodeno, intestino delgado e intestino grueso son órganos del aparato digestivo. Las glándulas salivales, el páncreas y el hígado son también componentes del aparato digestivo. Al mismo tiempo, los islotes β del páncreas, que secretan hormonas, también están relacionados con el sistema endocrino.

Dentro del significado de la presente invención, la terminología «miRNA abundante en órgano/tejido/tipo de célula» se refiere a todo miRNA que está presente en mayor cantidad (p. ej., concentraciones al menos 5 veces más altas) en un órgano, tejido o tipo de célula correspondiente, en comparación con otros órganos, tejidos o tipos de célula, y puede ser una fuente de cantidades detectables del miRNA en un líquido corporal que hay que analizar. La terminología «miRNA abundante en el sistema de órganos» se refiere a todo miRNA que está presente en mayor

cantidad (p. ej., concentraciones al menos 5 veces más altas) en todos, o al menos varios, órganos del correspondiente sistema de órganos, en comparación con otros sistemas de órganos, órganos, tejidos o tipos de células, y puede ser una fuente de cantidades detectables de miRNA en un líquido corporal que hay que analizar. Para ser útil en los métodos para diagnóstico de la presente invención, tales miRNA abundantes en el sistema de

5 órganos/órgano/tejido/tipo de célula deben ser detectables en los líquidos corporales como resultado de su liberación desde las células y de su transporte a dichos líquidos corporales.

El término «una enfermedad» se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a una enfermedad inespecífica que implica cambios metabólicos y/o estructurales en un órgano, tejido o tipo de célula correspondiente que está asociado a su disfunción y/o destrucción parcial y/o pérdida. El término «asociado a» se utiliza para abarcar cualquier correlación, concomitancia y cualquier relación de causa y efecto.

10 Los términos «micro-ARN» o «miRNA», tal y como se utilizan en la presente memoria, hacen referencia a una clase de moléculas de ARN, maduras, no codificantes y de tan solo aproximadamente 22 nt de largo. Desempeñan funciones importantes en la regulación de sus genes diana mediante la fijación a regiones complementarias de los mensajeros transcritos (ARNm) para reprimir su traducción y regular su degradación (Griffiths-Jones, *Nucleic Acids Research*, 2006, 34, número de bases de datos: D140-D144). Con frecuencia, un miRNA puede actuar selectivamente sobre muchos ARNm y un ARNm puede estar regulado en varias regiones diferentes de la UTR en 3' sobre las que actúan selectivamente los miRNA. Una vez fijado a un ARNm, un miRNA puede modular la expresión del gen y la producción de la proteína al afectar, p. ej., a la traducción y estabilidad del ARNm (Back et al., *Nature* 455 (7209): 64 (2008); Selbach et al., *Nature* 455 (7209): 58 (2008); Ambros, 2004, *Nature*, 431, 350-355; Bartel, 2004, *Cell*, 116, 281-297; Cullen, 2004, *Virus Research*, 102, 3-9; He et al., 2004, *Nat. Rev. Genet.*, 5, 522-531; y Ying et al., 2004, *Gene*, 342, 25-28). Ejemplos de miRNA abundantes en órgano/tejido/célula de utilidad para los métodos de la presente invención incluyen, sin limitación, los miRNA recogidos en la tabla 1. Los ejemplos de miRNA abundantes en sistemas de órganos que resultan para los métodos de la presente invención incluyen, sin limitación, los miRNA recogidos en la tabla 2, columna 2. Los ejemplos del miRNA abundantes en órgano/tejido/tipo de célula que resultan para la localización más precisa de una enfermedad en los métodos de la presente invención incluyen, sin limitación, los miRNA recogidos en la tabla 2, columna 3.

La información más actual sobre los miRNA conocidos se puede hallar en la base de datos de miRNA miRBase (disponible por la web en mirbase.org). Véase también Burside et al., *BMC Genomics* 9: 185 (2008); Williams et al., *BMC Genomics* 8: 172 (2007); Landgraf et al., *Cell* 129: 1401 (2007).

30 El término «matriz de miRNA», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una tecnología multiplex utilizada en la biología molecular y en la medicina. Consiste en una serie ordenada de varias (p. ej., miles) impresiones microscópicas de oligonucleótidos, cada una con una secuencia específica (sonda) complementaria a un miRNA diana determinado. Después de la hibridación entre la sonda y la diana en condiciones muy rigurosas, los híbridos resultantes se suelen detectar y cuantificar mediante la cuantificación de las dianas marcadas con fluoróforos, plata o quimioluminiscencia para determinar la abundancia relativa del miRNA. En los métodos de la presente invención se pueden utilizar tanto las matrices de miRNA disponibles en el mercado como las fabricadas por encargo. Los ejemplos no limitantes de matrices de miRNA útiles y disponibles en el mercado (basadas en diferentes métodos de marcación de dianas, detección de híbridos y análisis) incluyen las matrices producidas por Agilent, Illumina, Exiqon, Invitrogen, Febit y LC Sciences.

40 La terminología «tecnologías de secuenciación de nueva generación», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia en líneas generales a los métodos de secuenciación en los que se generan muchas reacciones de secuenciación en paralelo. Esto permite un enorme incremento de la producción y rendimiento de los datos. Los ejemplos no limitantes de las plataformas de secuenciación de nueva generación que se utilizan con frecuencia incluyen la secuenciación de ARN pequeños de Helicos, miRNA BeadArray (Illumina), Roche 454 (FLX-Titanium) y ABI SOLiD.

Un «individuo» o «sujeto» o «animal», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a humanos, animales veterinarios (p. ej., gatos, perros, vacas, caballos, ovejas, cerdos, etc.) y modelos de animales experimentales de enfermedades neurodegenerativas u otras enfermedades neuronales (véanse los ejemplos que aparecerán más adelante). En una realización preferida, el sujeto es un humano.

50 El término «vías urinarias» hace referencia a los órganos y conductos que participan en la secreción y eliminación de la orina del cuerpo.

El término «purificado», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un material que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales sin relación, a saber, contaminantes, que incluyen materiales nativos de los cuales se obtiene el material. Por ejemplo, la purificación del ARN incluye la eliminación de proteínas, lípidos, sales y otros compuestos sin relación presentes en los líquidos corporales.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «sustancialmente libre» se utiliza operativamente en el contexto de las pruebas analíticas del material. Preferiblemente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es puro al menos al 50%; más preferiblemente, puro al menos al 90%; y aún más preferiblemente

puro al menos al 99%. La pureza se puede evaluar por cromatografía, electroforesis en gel, análisis de la composición, ensayo biológico y otros métodos conocidos en la técnica.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «procesado de la misma forma» hace referencia a que las muestras (p. ej., muestras de líquidos corporales o ARN purificados) se han obtenido con el mismo protocolo.

- 5 La terminología «una concentración de control», tal y como se utiliza en la presente memoria, abarca estándares predeterminados (p. ej., un valor publicado en una referencia), así como las concentraciones determinadas experimentalmente en muestras de sujetos de control procesadas de la misma forma (p. ej., sujetos sanos emparejados por edad y sexo). Ya que en la presente invención se describen las pruebas de detección que se pueden realizar para el mismo paciente de forma periódica, los datos previos del mismo individuo se pueden utilizar como una «concentración de control».

10 Para distinguir entre dos enfermedades, tales como el cáncer y la inflamación, o el cáncer de esófago y el cáncer colorrectal, las razones de las concentraciones de los miRNA en el plasma no se compararán con las razones de los controles determinados previamente, sino con los márgenes ya determinados de las razones de las concentraciones de los miRNA en el plasma, que son características de las enfermedades correspondientes. Para definir estas razones, se incorporarán varios cientos de pacientes y las concentraciones de los miRNA de interés se medirán en las muestras de los plasmas. A continuación, se calcularán las razones de las concentraciones de diferentes parejas de miRNA, lo que proporcionará el margen de razones característico de la correspondiente enfermedad y que cubrirá, por ejemplo, del 100%, 99% o 95% de los casos de la enfermedad. El margen predeterminado utilizado en el contexto clínico real se determinará según las necesidades de sensibilidad y especificidad de la prueba.

- 20 La terminología «unos» o «aproximadamente» significa que está dentro de un margen estadísticamente significativo de un valor. Tal margen puede estar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro del 50%, más preferiblemente dentro del 20%, aún más preferiblemente dentro del 10%, e incluso más preferiblemente dentro del 5%, de un valor o margen dados. La variación permitida abarcada por el término «unos» o «aproximadamente» depende del sistema concreto en estudio, y el experto en la técnica lo apreciará con facilidad.

25 De acuerdo con la presente invención, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la metodología de la técnica. Tales técnicas se explican en detalle en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (en la presente memoria «Sambrook et al., 1989»); *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B. D. Hames y S. J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription and Translation* [B. D. Hames y S. J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R. I. Freshney ed. (1986)]; *Immobilized Cells and Enzymes* [IRL Press (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Ausubel, F. M. et al. (eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 1994. Estas técnicas incluyen la mutagénesis dirigida específica de sitio, tal y como se describe en Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492 (1985), patente de los EE. UU. n.º 5.071.743, Fukuoka et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 357-360 (1999); Kim y Maas, *BioTech.* 28: 196-198 (2000); Parikh y Guengerich, *BioTech.* 24: 428-431 (1998); Ray y Nickoloff, *BioTech.* 13: 342-346 (1992); Wang et al., *BioTech.* 19: 556-559 (1995); Wang y Malcolm, *BioTech.* 26: 680-682 (1999); Xu y Gong, *BioTech.* 26: 639-641 (1999), patentes de los EE. UU. n.ºs 5.789.166 y 5.932.419, Hogrefe, *Strategies* 14. 3: 74-75 (2001), patentes de los EE. UU. n.ºs 5.702.931, 5.780.270 y 6.242.222, Angag y Schutz, *BioTech.* 30: 486-488 (2001); Wang y Wilkinson, *BioTech.* 29: 976-978 (2000); Kang et al., *Biotech.* 20: 44-46 (1996); Ogel y McPherson, *Protein Engineer.* 5: 467-468 (1992); Kirsch y Joly, *Nucl. Acids. Res.* 26: 1848-1850 (1998); Rhem y Hancock, *J. Bacteriol.* 178: 3346-3349 (1996); Boles y Miogsa, *Curr. Genet.* 28: 197-198 (1995); Barrentino et al., *Nucl. Acids. Res.* 22: 541-542 (1993); Tessier y Thomas, *Meths. Molec. Biol.* 57: 229-237, y Pons et al., *Meth. Molec. Biol.* 67: 209-218.

- 45 El término «datos etiquetados» utilizado para el conjunto de datos de entrenamiento se refiere a los resultados de análisis obtenidos en las muestras clínicas de personas con un diagnóstico conocido. Por ejemplo, para los datos etiquetados para los miRNA con destino en el hígado, los datos se deben recoger de personas con enfermedades hepáticas (etiqueta «hígado» y, p. ej., «hepatitis» o «carcinoma hepatocelular») y sin ninguna enfermedad hepática (etiqueta «control»).

50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «conjunto de datos» se refiere a un conjunto de miRNA (biomarcadores) seleccionados para detectar una enfermedad en un sistema de órganos/órgano/tejido/tipo de célula determinado. Cada conjunto de datos comprende al menos un biomarcador, pero típicamente más biomarcadores, y algunos biomarcadores son miembros de más de un conjunto de datos.

55 El término «K-base» se refiere a una base de datos que contiene el conocimiento sobre todos los tipos de pruebas de detección y sus componentes. La información se agrupa en el conjunto de tablas independientes, tales como:

- lista de todas las pruebas de detección desarrolladas hasta la fecha;
- lista de todas las enfermedades cubiertas por esas pruebas;

- lista de los miRNA utilizados (y que se supone que podrán usar);
- lista de conjuntos de datos para todas las pruebas de detección;
- relaciones entre el tipo de pruebas de detección, los conjuntos de datos y los miRNA;
- tablas que contienen constantes de cada miRNA utilizado en los correspondientes conjuntos de datos.

5 Estas tablas se han de rellenar en la etapa de aprendizaje de los algoritmos y utilizarse para los cálculos en la parte de clasificación del algoritmo.

Esta base de datos se modifica y se expande con la llegada de nuevos datos de investigación verificados.

10 El término «I-base» se refiere a una base de datos que contienen datos reales de las pruebas de detección en los individuos, que incluye listas de sujetos e información relevante, historia de las pruebas de detección, sus datos brutos y los resultados procesados, etc.

Ambas bases de datos, junto con los programas y los algoritmos que se implementan para el aprendizaje y la clasificación, son parte de la presente invención.

El término «iteración» se utiliza en la descripción del algoritmo. Se refiere al cuerpo del bucle de programación, que se ejecuta de forma cíclica.

15 Ejemplos

La presente invención también se describe y se demuestra por medio de los ejemplos que vienen a continuación. Sin embargo, el uso de estos y otros ejemplos en cualquier parte de la especificación solo es con fines ilustrativos y en ningún modo limita el alcance ni el significado de la invención ni de cualquier término de ejemplo. Asimismo, la invención no se limita a ninguna realización preferida concreta que se describa aquí. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención podrían resultar evidentes para los expertos en la técnica después de leer esta especificación, y tales variaciones se pueden realizar sin alejarse del espíritu ni del alcance de la invención. Por lo tanto, la invención está limitada solo mediante los términos de las reivindicaciones adjuntas junto con el alcance total de las equivalencias que estas reivindicaciones tendrán derecho a exigir.

25 Ejemplo 1: comparación de los diferentes métodos utilizados para la purificación de los miRNA desde el suero y desde el plasma

Hay muchos kits comerciales para aislar los miRNA, entre ellos el kit miRNeasy (Qiagen), el kit de aislamiento de ARN MirVana (Ambion/ABI), miRACLE (Agilent), kit de aislamiento del miRNA High Pure (Roche) y kit de purificación de miRNA (Norgen Biotek Corp.). Además, se utilizan con frecuencia las técnicas de uso interno basadas en el empleo de Trizol (Invitrogen). Después de la desproteinización con Trizol, se precipita el ARN con alcohol isopropílico o se purifica adicionalmente en columnas de sílice. En algunos experimentos, el ARN purificado se trata con ADNasa libre de ARNasa (Qiagen, ABI, Invitrogen u otro). Las preparaciones de miRNA obtenidas mediante diferentes métodos se comparan por RT-PCR.

35 El miRNA se purificó de muestras de plasma y de suero obtenidas de los mismos 5 donantes sanos. Se enriquecieron con 107 copias del miR-159a de *Arabidopsis thaliana* (ath-miR-159a) por cada mililitro de plasma o de suero después de añadir una solución que contiene guanidina para evaluar el rendimiento de los miRNA. Se compararon dos técnicas, una basada en el kit París MirVana (Ambion/ABI) y la otra basada en la desproteinización con Trizol (Invitrogen) y la posterior purificación en columnas de sílice. Después de la purificación del ARN, se midió la concentración del miRNA enriquecido y de miR-9, miR-16 y miR-134, endógenos de humano, en las preparaciones finales por RT-PCR. El kit París MirVana fue más eficaz a la hora de aislar el miRNA que la técnica basada en Trizol y se seleccionó para futuros experimentos. Aunque todos los miRNA analizados eran detectables en el suero y en el plasma, y ambos tipos de muestras eran idóneas para las pruebas de miRNA, los valores de Ct finales de la PCR eran aproximadamente 2 ciclos más bajos para el plasma, y esto último se utilizó para los posteriores experimentos. Basándose en la medición cuantitativa del enriquecimiento en ath-miR-159a, la producción media de miRNA aislados del plasma con el kit MirVana era el 71,4%.

45 Ejemplo 2: Selección de los miRNA para la prueba

Los posibles miRNA biomarcadores (tabla 1) se seleccionaron inicialmente basándose en los datos de la bibliografía sobre su abundancia en diferentes órganos y tejidos (véase, p. ej., Hua et al., *BMC Genomics* 2009, 10: 214; Liang et al., *BMC Genomics*, 2007, 8: 166; Landgraf et al., *Cell*, 2007, 129: 1401-1414; Lee et al., *RNA*, 2008, 14: 35-42; <http://ferrolab.dmi.unict.it/miro/>; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir>). A continuación, los miRNA comunes de varios órganos del mismo sistema de órganos se seleccionaron como posibles biomarcadores para el correspondiente sistema (tabla 2, columna 2). Los miRNA que son abundantes en un órgano, pero no en otros órganos del sistema, se identificaron como posibles biomarcadores para una localización más precisa de la

enfermedad (tabla 2, columna 3). Para la normalización, además del miRNA no humano sintético enriquecido, p. ej., ath-miR-159a, y los miRNA ubicuos, tal como miR-16 y miR-30e-3p, se seleccionaron los miRNA expresados en numerosos tejidos, pero no en un tejido deseado. Por ejemplo, miR-10b y miR-141 se pueden utilizar para normalizar los biomarcadores del cerebro y miR-409-3p para los biomarcadores del aparato respiratorio, etc. Se seleccionaron experimentalmente otros normalizadores prometedores, que son abundantes en los tejidos, órganos y sistemas analizados.

Todos estos biomarcadores tienen que incluirse como un correspondiente conjunto de datos en la K-base, según se describe en el ejemplo 8, más adelante.

Ejemplo 3: Detección de un incremento de la concentración de los miRNA abundantes en el cerebro en el suero/plasma de los pacientes diagnosticados con enfermedades neurológicas

En el estudio se utilizaron muestras de plasma de pacientes amnésicos con TLC y EA, y CEE, 20 en cada grupo. El ARN se aisló de dos alícuotas de 200 µl de muestras de plasma mediante el método de Trizol-sílice de acuerdo con el procedimiento de Asuragen. La qRT-PCR de una sola diana se realizó con el kit de retrotranscripción TaqMan® y los cebadores ahorquillados (Applied Biosystems) específicos de los miRNA. La etapa de RT se realizó por triplicado y en la PCR final estaban presentes 2 µl equivalentes del plasma.

Los datos presentados en las figuras 1 a 6 demuestran el incremento de 2 a 5 veces de la mediana de la concentración de los miRNA de los axones y de las sinapsis (miR-7, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-134, miR-323-3p, miR-382, miR-874) en el plasma de pacientes con TLC y EA cuando se compararon con los controles emparejados por edad. El efecto es más prominente cuando la normalización se realiza por un miRNA abundante en el cerebro, tal como miR-9, miR-127, miR-181a, miR-370 y miR-491-5p.

Dos familias de biomarcadores, las familias de miR-132 y miR-134, y varios normalizadores han mostrado la sensibilidad y especificidad más altas. Las curvas de eficacia diagnóstica (ROC) para estas combinaciones de biomarcadores y un normalizador se presentan en las figuras 7A-C y 8A-C. Los biomarcadores miR-128, miR-132 y miR-874 («familia de miR-132») mostraron una sensibilidad del 84 al 92% y una especificidad del 84 al 90% cuando se normalizaron por miR-491-5p. El área bajo la curva (ABC) ROC para miR-128, miR-132 y miR-874 es de 0,95, 0,93 y 0,95, respectivamente. El segundo conjunto prometedor de biomarcadores consiste en miR-134, miR-323-3p y miR-382 («familia de miR-134») y muestra una sensibilidad del 78% al 91% y una especificidad del 85% al 87% cuando se normalizó por miR-370. El ABC para miR-134, miR-323-3p y miR-382 es de 0,91, 0,94 y 0,92, respectivamente.

El análisis de correlación mostrado en las figuras 9A-F demuestra que miR-128, miR-132 y miR-874 forman una familia de biomarcadores (los valores r de la prueba de Spearman en la comparación por parejas están en el margen de 0,93 a 0,95) y miR-134, miR-323-p y miR-382 forman otra familia de biomarcadores (los valores r de la prueba de Spearman en la comparación por parejas están en el margen de 0,87 a 0,93). La alta correlación entre los miembros de la familia de miR-134 se puede explicar con facilidad por el hecho de que todos los miembros de esta familia, a saber, miR-134, miR-323-3p y miR-382, pertenecen al mismo agrupamiento y se expresan en los mismos tipos de células (<http://www.diana.pcbi.upebnn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Cluster.cgi>). La estrecha relación entre los miembros de la familia de miR-132, a saber, miR-128, miR-132 y miR-874, no se había descrito antes. Es también interesante que las familias de biomarcadores miR-132 y miR-134 producen los mejores resultados con diferentes normalizadores. La familia de miR-132 funciona mejor que la familia de miR-134 con los normalizadores miR-491-5p, miR-181a, miR-9 y miR-141. Por otra parte, la familia de miR-134 muestra mejores resultados que la familia de miR-132 con los normalizadores miR-370 y miR-127. La correlación entre las familias de biomarcadores de miR-132 y de miR-134 es relativamente baja (los valores de r en la prueba de Spearman de la comparación por parejas están en el margen de 0,56 a 0,79), lo que indica que reflejan diferentes procesos patológicos, o bien que están localizados en diferentes áreas del cerebro.

Ejemplo 4: Detección de un incremento de la concentración de los miRNA abundantes en el pulmón en el suero/plasma de pacientes con enfermedades pulmonares

Las muestras de plasma se obtuvieron de pacientes a los que se les diagnosticó diferentes enfermedades pulmonares, tales como asma, neumonía, enfermedad obstructiva pulmonar crónica (EPOC) y carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM), 10 en cada grupo. Ya que los pacientes participantes que sufrían asma y neumonía no eran fumadores y los pacientes con EPOC y CPNM eran fumadores, también se recogieron muestras de plasma de dos grupos de control, fumadores y no fumadores, 10 en cada grupo. El ARN se aisló de dos alícuotas de 200 µl de las muestras de plasma mediante el método de Trizol-sílice de acuerdo con el procedimiento de Asuragen. La qRT-PCR de una sola diana se realizó con el kit de retrotranscripción TaqMan® y los cebadores ahorquillados específicos del miRNA (Applied Biosystems). La etapa de RT se realizó por triplicado y en la PCR final estaban presentes 2 µl equivalentes del plasma para medir la concentración de miR-34b, miR-142-5p, miR-146-5p, miR-155, miR-223, miR-486-5p, abundantes en el pulmón, así como la concentración de miR-192 y miR-409-3p ubicuos y abundantes en el aparato digestivo. Los últimos son esencialmente ubicuos, pero están subexpresados en el pulmón. La concentración de cada miRNA abundante en el pulmón se normalizó por miR-409-3p y miR-192, así como entre sí,

se convirtieron en la cantidad relativa (CR) de miRNA de acuerdo con el protocolo ABI ($2^{-\Delta Ct}$) y se compararon con los perfiles de miRNA de los controles.

Tal y como se esperaba, se encontró que miR-34b y miR-486-5p, que son muy abundantes en el pulmón, son biomarcadores eficaces, y que miR-409-3p es un normalizador eficaz (figura 10A-D). Otros normalizadores eficaces que abundan en el pulmón son miR-142-5p, miR-146b-5p, miR-155 y miR-223 (figuras 11A-H y 12A-H) lo que, al menos en algunos casos, se podría explicar por su represión en las enfermedades pulmonares (Liu X. et al. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15: 1177-1183; Miko E. et al., *Exp. Lung Res.* 2009, 35: 646-664; Halappanavar S. et al. *Toxicology* 2011, 285: 133-141; Heegaard NH et al. *Int. J. Cancer*, 2012, 130: 1378-1386). Inesperadamente, el miR-192 también se comportó como un biomarcador eficaz (figura 13A-J). Ya que este miRNA también se demostró que era un biomarcador para las enfermedades del aparato digestivo, resulta razonable sugerir que se incrementa la expresión y/o secreción de este miRNA debido a la inflamación o al desarrollo de tumores (Benjamin H. et al., *J. Mol. Diagn.* 2010, 12: 771-779; Lan H. Y. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28 de diciembre de 2011 [Epub anterior a la versión impresa]; Luzna P. et al. *Diagn. Pathol.* 2011, 6: 114; Wu Q. et al. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, Epub, 26 de mayo; Zhou J. et al., *J. Clin. Oncol.* 2011, 29: 4781-4788).

Las razones miRNA biomarcador/miRNA normalizador no eran diferentes para los controles de fumadores y de no fumadores. Así pues, se pudieron comparar diferentes enfermedades con los controles combinados (sujetos fumadores y no fumadores). La figura 14A-C muestra que las cuatro enfermedades analizadas se diferencian con eficacia de tales controles combinados mediante diferentes conjuntos de miRNA biomarcadores y normalizadores, p. ej., miR-34b normalizado por miR-409-3p, miR-486-5p normalizado por miR-223 o miR-192 normalizado por miR-155. También había otros conjuntos eficaces de miRNA biomarcadores y normalizadores.

También se analizó la capacidad que tienen diferentes combinaciones de miRNA biomarcadores y normalizadores para diferenciar entre el CPNM y las enfermedades inflamatorias, tales como el asma, la neumonía y la EPOC. La figura 15A-C muestra que los pacientes con CPNM se diferencian de los pacientes con enfermedades inflamatorias gracias al uso de las razones de miR-34b por miR-155, miR-486-5p por miR-146b-5p o miR-192 por miR-146b-5p. Había otras combinaciones eficaces de miRNA biomarcadores y normalizadores.

Ejemplo 5: Detección de un incremento de la cantidad de los miRNA abundantes en el aparato digestivo en el suero y plasma de pacientes con enfermedades del aparato digestivo

Las muestras de plasma se obtuvieron de pacientes a los que se les diagnosticó diferentes enfermedades del aparato digestivo, tales como el cáncer de esófago, gástrico y de colon, y una afección inflamatoria, la enfermedad de Crohn, 10 en cada grupo. El ARN se aisló de dos alícuotas de 200 µl de muestras de plasma mediante el método de Trizol-silíce de acuerdo con un procedimiento de Asuragen. La qRT-PCR de diana única se realizó con el kit de retrotranscripción TaqMan® y los cebadores ahorquillados específicos del miRNA (Applied Biosystems). La etapa de RT se realizó por triplicado y en la PCR final estaban presentes 2 µl equivalentes del plasma para medir la concentración de miR-145, miR-148a, miR-192, miR-194, miR-203 y miR-215, abundantes en los órganos del aparato digestivo, así como la concentración del ubicuo miR-30e-3p. La concentración de cada miRNA abundante en el aparato digestivo se normalizó por el miR-30e-3p así como entre sí, se convirtieron en la cantidad relativa (CR) de miRNA de acuerdo con el protocolo de ABI ($2^{-\Delta Ct}$) y se compararon con los perfiles de miRNA de los controles. La figura 16A-L muestra claramente que miR-192, miR-194, miR-203 y miR-215 son biomarcadores eficaces, y que miR-145, miR-148a y miR-30e-3p son normalizadores eficaces. Las razones biomarcador/normalizador diferencian con eficacia entre los pacientes con todas las enfermedades estudiadas y los controles. El miR-203, muy abundante en el esófago y en el estómago, es especialmente eficaz a la hora de detectar cánceres de estos órganos, y el miR-215, muy abundante en la columna, es más eficaz para diferenciar entre los pacientes con cáncer de colon o la enfermedad de Crohn y los controles. La combinación de miR-192 y miR-203 normalizada por miR-30e-3p diferencia con eficacia entre los pacientes con todas las enfermedades del aparato digestivo y los controles (figura 16M) con una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100% calculadas como se describe en el ejemplo 8. Es importante que todos los tumores estén en el estadio 1 o 2, lo que significa que la estrategia propuesta se puede utilizar con eficacia para la detección sistemática y el diagnóstico precoz.

Además, se compararon diferentes cánceres entre sí, y la enfermedad de Crohn se comparó con todos los cánceres del aparato digestivo. Como resultado, se hallaron las siguientes razones de biomarcador/normalizador capaces de diferenciar determinadas enfermedades:

1. Enfermedad de Crohn frente a los cánceres de esófago, gástrico y colorrectal: miR-194/miR-148a; miR-215/miR-30e-3p; miR-215/miR-194; miR-203/miR-148a; miR-192/miR-203; miR-215/miR-203 y miR-194/miR-192 (figura 17A-G).
2. Cáncer de esófago frente a cáncer gástrico: miR-194/miR-145; miR-194/miR-148a; miR-194/miR-30e-3p (figura 18A-C).
3. Cáncer gástrico frente a cáncer colorrectal: miR-203/miR-30e-3p; miR-203/miR-148a; miR-215/miR-203 (figura 18D-F).

4. Cáncer de esófago frente a cáncer colorrectal: miR-192/miR-145; miR-192/miR-148a; miR-192/miR-30e-3p (figura 18G-I).

Así pues, el análisis de la concentración en el plasma de los miRNA abundantes en los órganos del aparato digestivo es eficaz para: (i) la detección de la enfermedad de Crohn y tumores en el esófago, estómago y colon; (ii) la diferenciación entre una enfermedad inflamatoria y los cánceres; (iii) la diferenciación de los cánceres localizados en diferentes órganos del aparato digestivo.

Ejemplo 6: Diferenciación de las enfermedades de diferentes sistemas de órganos

Se utilizaron en el estudio las preparaciones de miRNA purificados de muestras de plasma obtenidas de los pacientes descritos en los ejemplos 4 y 5. Se estudió la capacidad que tienen las diferentes combinaciones de miRNA para diferenciar entre los pacientes con enfermedades del aparato digestivo (enfermedad de Crohn y cáncer de esófago, gástrico y colorrectal) y los pacientes con enfermedades de aparato respiratorio (asma, neumonía, EPOC y CPNM). Se incluyeron en el estudio miR-126, miR-146b-5p, miR-155 y miR-486-5p abundantes en el pulmón, y miR-145, miR-192, miR-203 y miR-215 abundantes en el aparato digestivo. La expresión de algunos de estos miRNA (tabla 3) se sabe que está desregulada en las enfermedades de diferentes órganos. Además, se analizaron miR-17-5p y miR-31, implicados en procesos patológicos de diferentes órganos, así como miR-30e-3p y miR-409-3p, que se utilizaron como normalizadores en los experimentos 4 y 5. El ARN se aisló de dos alícuotas de 200 µl de las muestras de plasma mediante el método de Trizol-sílice de acuerdo con un procedimiento de Asuragen. Los ensayos de qRT-PCR TaqMan® (Applied Biosystems) de una sola diana para miRNA se realizaron por triplicado con 2 µl equivalentes del plasma en un volumen de reacción de 10 µl para la PCR final. Las concentraciones de cada miRNA se normalizaron por miR-30e-3p y miR-409-3p así como entre sí, se convirtieron en cantidad relativa (CR) de miRNA de acuerdo con el protocolo de ABI ($2^{-\Delta Ct}$), y se compararon los perfiles de miRNA característicos de los pacientes con las enfermedades de los aparatos respiratorio y digestivo. Las figuras 19A-U demuestran que muchas parejas de miRNA distinguen con eficacia entre los pacientes con enfermedades de los aparatos respiratorio y digestivo: miR-192/miR-126; miR-155/miR-126; miR-145/miR-126; miR-155/miR-30e-3p; miR-192/miR-30e-3p; miR-155/miR-409-3p; miR-486-5p/miR-17-5p; miR-155/miR-17-5p; miR-192/miR-17-5p; miR-146b-5p/miR-31; miR-155/miR-31, miR-192/miR-31; miR-486-5p/miR-155; miR-192/miR-155; miR-145/miR-155; miR-146b-5p/miR-155; 486-5p/miR-203; miR-192/miR-203; miR-145/miR-203; miR-192/miR-215; miR-155/miR-215.

La combinación de dos parejas de miRNA incrementa la exactitud de la prueba. Las figuras 19V y 19W proporcionan un ejemplo con la combinación de las razones miR-145/miR-155 y miR-486-5p/miR-155, que diferencian los pacientes con todas las enfermedades del aparato digestivo entre los pacientes con enfermedades pulmonares con una sensibilidad del 95%, una especificidad del 90% y una exactitud del 93%.

Ejemplo 7: Diferenciación entre los cánceres y las enfermedades inflamatorias

Las mismas muestras de plasma que se estudiaron en el ejemplo 6 se utilizaron para la purificación del ARN y se analizaron los mismos miRNA. En este estudio se exploró la capacidad que tienen las diferentes combinaciones de miRNA para diferenciar entre los pacientes con enfermedades inflamatorias (asma, neumonía, EPOC y enfermedad de Crohn) y los pacientes con diferentes cánceres (cáncer de esófago, gástrico, colorrectal y pulmonar no microcítico). Las figuras 20A-F muestran que varias parejas de miRNA diferencian con eficacia entre los pacientes con enfermedades inflamatorias y los pacientes con diferentes cánceres: miR-17-5p/miR-155; miR-192/miR-155; miR-215/miR-155; miR-192/miR-30e; miR-146b-5p/miR-30e-3p; miR-155/miR-30e-3p. Hay menos parejas de miRNA que diferencian entre las enfermedades inflamatorias y los cánceres que parejas de miRNA capaces de diferenciar entre las enfermedades del aparato respiratorio y las enfermedades del aparato digestivo. Primero, los cambios de expresión de muchos miRNA son característicos de ambos tipos de enfermedad. Segundo, en muchos casos, la carcinogénesis viene acompañada por una inflamación relativamente prominente.

La combinación de dos parejas de miRNA incrementa la exactitud de la prueba. Las figuras 20G y 20H dan a conocer un ejemplo con la combinación de las razones de miR-146b-5p/miR-155 y miR-146b-5p/miR-30e-3p, que distinguen a todos los pacientes con enfermedades inflamatorias entre los pacientes con cáncer con una sensibilidad del 80%, especificidad del 98% y una exactitud del 89%.

Así pues, los resultados de los experimentos presentados más arriba apoyan las principales ideas de la presente invención. El análisis de la concentración en el plasma de los miRNA abundantes en un sistema de órganos, o en un órgano, determinado diferencia entre: (i) las enfermedades de sistemas de órganos y los controles, (ii) las enfermedades de tres órganos del aparato digestivo; (iii) las enfermedades del aparato respiratorio y del digestivo; (iv) los cánceres y las enfermedades inflamatorias.

Ejemplo 8: Un método para el análisis de varios miRNA y su uso para la selección de biomarcadores y la detección de un sistema de órganos o un órgano concreto con cambios patológicos

Se utilizaron dos aplicaciones diferentes para el desarrollo de la PDU (en fase de investigación) y su uso clínico (procesamiento de los datos para detección). Los algoritmos de ambas aplicaciones contienen partes de entrenamiento y de clasificación, pero son significativamente diferentes.

El algoritmo utilizado para el desarrollo de la prueba de detección

En la descripción del algoritmo que aparecerá más adelante y las figuras relacionadas, el término «biomarcador» define una pareja de miRNA, marcador y normalizador, utilizada para el diagnóstico de la enfermedad y más en general para diferenciar diferentes grupos de sujetos. El término «ROC» significa curva de eficacia diagnóstica, que es la prueba estadística utilizada en la clasificación.

El algoritmo propuesto se basa en las siguientes suposiciones simplificadas:

- Para cualquier biomarcador o combinación de biomarcadores, está disponible un pequeño número, p. ej., ≤ 20 , de experimentos;
- La respuesta de cualquier biomarcador a una enfermedad determinada se puede explorar de forma independiente y no se debe conectar a la combinación «final» de biomarcadores asignados a un conjunto de datos concreto;
- Los algoritmos deben ser probabilísticos, lo que permite una estimación del mejor resultado.

La primera parte del algoritmo está relacionada con el entrenamiento a partir de los datos etiquetados para una enfermedad de un sistema de órganos, órgano, tejido o tipo de célula correspondiente. La figura 21A esboza las operaciones de esta parte del algoritmo.

Esta parte supone un diálogo intenso, prácticamente en cada etapa, con la persona que realiza los experimentos. La primera etapa siempre incluye alguna operación manual, o escribir valores de muestras, o realizar operaciones para importar los datos, de forma parcial o completa, desde algunos documentos estándares. El tipo de documento puede ser, pero sin limitarse a ellos, una hoja de cálculo para Excel, o un archivo de texto delimitado por tabuladores. Las demás etapas se pueden realizar de forma automática, con solo la confirmación manual, como «siguiente», o puede tener algunas correcciones manuales. Por ejemplo, en la etapa de normalización se debe proporcionar el mejor tipo de normalización o realizar todo el procesamiento con varios tipos de normalizaciones. Algunas muestras pueden tener valores fuera de un determinado margen estadísticamente razonable. Como norma, este margen es un múltiplo de la desviación estándar, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, dos o tres veces la desviación estándar, según la distribución del valor (cuán próxima está a la normalidad, etc.), se puede tomar una decisión sobre si descartar estas muestras de la estadística, etc. El análisis estadístico incluye el cálculo del valor de P para la separación entre esperado y control, y los parámetros de la curva ROC (curva de eficacia diagnóstica). La última etapa del algoritmo (tomar la decisión de añadir el marcador) puede incluir partes (bucle interno) del algoritmo de clasificación, que se describe más adelante. En esta etapa, los parámetros calculados se aplican al conjunto de entrenamiento. La decisión de utilizar este marcador se basa en el nivel del éxito de la clasificación. Esta decisión se puede reconsiderar en la etapa de clasificación.

La parte de clasificación del algoritmo se muestra en la figura 21B.

La segunda parte del algoritmo, la clasificación, se utiliza principalmente para el proceso con los datos de validación. De igual forma, una parte de él, el bucle interno, se puede utilizar en la última etapa del algoritmo de entrenamiento. En general, en la etapa de investigación, estas partes (el procedimiento de entrenamiento y el procedimiento de clasificación) se utilizan de manera iterativa, es decir, se repiten varias veces, para que la prueba alcance una exactitud aceptable desde el punto de vista clínico.

El procedimiento de clasificación contiene dos bucles de iteración anidados, a través de conjuntos de datos (bucle externo) y biomarcadores en cada conjunto de datos (bucle interno).

Las etapas de iteración a lo largo del bucle interno de biomarcadores incluyen:

Etapas 1. normalización de los biomarcadores del conjunto de datos

La normalización puede incluir una normalización general de la prueba de detección (una por prueba) basada en el miRNA enriquecido, y una normalización específica para un conjunto de datos concreto, de tipo b), c) o d) (véase el apartado Descripción detallada de la invención, más arriba) o más de uno de ellos. La versión de la normalización específica utilizada para cada biomarcador se incluye en la K-base como una descripción del conjunto de datos. Así pues, si un biomarcador es un miembro de más de un conjunto de datos, se debe normalizar en consonancia en cada conjunto.

Etapas 2. Cálculo de probabilidades de los biomarcadores

La concentración de los biomarcadores para una persona concreta se tiene que mapearse entre dos posibilidades: tener la enfermedad o no tenerla. La operación de mapeo utiliza dos funciones de probabilidad, basándose en el procesamiento de los datos de los biomarcadores de dos poblaciones: con enfermedad y sin enfermedad (control). Cada función de probabilidad es una curva ajustada a una línea, que va de 1 a 0 para la población de control, y de 0 a 1 para la población con la enfermedad deseada. La descripción de cada curva se almacena, recupera y actualiza

en la K-base.

Etapas de iteración para el bucle del conjunto de datos (etapas de datos externos)

Las partes significativas de las curvas de la diana y del control están solapadas. Si un valor real está dentro de este área de solapamiento, es necesario tomar una decisión sobre cómo interpretar el resultado. Esta se basa, pero sin limitarse a ello, en la comparación de la probabilidad de tener la enfermedad y de estar libre de ella; analizar los datos de los biomarcadores existentes para la misma persona si tales datos se han tomado y almacenado en la I-base.

Esto es el final de las iteraciones de los biomarcadores.

Etapas de iteración para el bucle del conjunto de datos (etapas de datos externos)

Etapas de iteración para el bucle del conjunto de datos (etapas de datos externos)

En muchos casos, los biomarcadores, que están incluidos en un conjunto de datos concreto, son estadísticamente independientes, esto es, la probabilidad que el valor de la concentración concreta pertenezca al grupo control o al grupo diana no depende significativamente del valor o valores de otros biomarcadores del conjunto de datos. En ese caso, se ha calculado la suma ponderada de las probabilidades para los biomarcadores que comprenden este conjunto de datos. Por defecto, todas las ponderaciones son iguales, p. ej., para tres biomarcadores, cada ponderación es 1/3. No obstante, las ponderaciones individuales se pueden almacenar en la K-base para cada biomarcador dentro de este conjunto de datos. Se pueden basar en algunos parámetros de la curva ROC de los biomarcadores, como sensibilidad, especificidad o ABC (área bajo la curva). La suma de las ponderaciones para todos los biomarcadores de cualquier conjunto de datos debe ser 1.

En el caso de una interdependencia significativa de algunos biomarcadores en un conjunto de datos concreto, la K-base contiene una descripción de la superficie multidimensional de probabilidades para este grupo, en donde hay tantas dimensiones como número de biomarcadores dependientes en el grupo. Mediante el uso de esta descripción, cada combinación de valores de los biomarcadores se mapea a dos posibilidades. Si el conjunto de datos contiene también biomarcadores independientes, las probabilidades de los conjuntos de datos se calculan con la suma ponderada de probabilidades para el grupo o grupos de biomarcadores dependientes, y la cada uno de los biomarcadores independientes.

Etapas de iteración para el bucle del conjunto de datos (etapas de datos externos)

Como norma, el resultado debe presentarse como POSITIVO o NEGATIVO para la enfermedad deseada. En casos especiales, también se puede utilizar el resultado INDETERMINADO con un porcentaje adjunto. Los parámetros para la toma de decisiones se deben definir y almacenar en la K-base con anterioridad. Pueden ser para toda la detección, o específicos de la diana (sistema de órganos/órgano/tejido) y aplicarse a las probabilidades, calculadas en la etapa anterior (etapa de datos 1). Estos parámetros se pueden aplicar a cada una de dos probabilidades (PP: probabilidad de patología, PC: probabilidad de control) o, con más frecuencia, para diferenciar las dos. Ejemplos: (i) el parámetro de la diferencia es 0, a saber, $PP > PC$ significa POSITIVO, $PP < PC$ significa NEGATIVO; (ii) $PP - PC \leq 0,25$ es NEGATIVO, $PP - PC \geq 0,35$ POSITIVO, e INDETERMINADO si está entre ellos; (iii) $PP > 0,6$ es POSITIVO, $PC > 0,7$ es NEGATIVO, todo lo demás es INDETERMINADO.

Etapas de iteración para el bucle del conjunto de datos (etapas de datos externos)

Se muestran los resultados y se guardan en la I-base, junto con los datos de identificación, tales como el número de la prueba, estampas de fecha y hora, identificación del paciente, etc.

El algoritmo para el ensayo clínico y su uso

Cuando ha terminado la etapa de investigación, la K-base contiene todos los componentes de la PDU y sus versiones: biomarcadores, conjuntos de datos y constantes para la clasificación. En la siguiente etapa se llevan a cabo estudios clínicos más grandes con el uso de estas herramientas.

Basándose en el resultado obtenido, se realizan la verificación y la evaluación de los biomarcadores y de los conjuntos de datos, así como algunas modificaciones del algoritmo y/o constantes. Por ejemplo, se pueden utilizar un algoritmo de clasificación diferente, como la regresión logística multinomial (Hosmer D. W., Lemeshow S. *Applied logistic regression*. Wiley, 2000; Allison P. D. *Logistic regression using the SAS system: theory and application*. Wiley, 2008) o las máquinas de soporte vectorial (Cristianini N, Shawe-Taylor J. *An introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-based Learning Methods*. Cambridge Press, 2000; Abe S. *Support Vector Machines for Pattern Classification*. Springer, 2010). La K-base recibe algunos cambios en consonancia. Después de tales cambios, se realizarán los ensayos clínicos.

En el uso clínico, el algoritmo de clasificación utiliza constantes y parámetros de la K-base y los datos problema reales se almacenan en la I-base. La K-base permanece intacta hasta la siguiente revisión, a saber, la llegada de

nuevos datos verificados de investigación.

En general, cualquiera de los algoritmos, operaciones funcionales o asunto importante descritos en esta especificación se pueden implantar en un circuito electrónico digital o en un programa informático, microcódigo o equipo informático, lo que incluye las estructuras descritas en esta especificación y sus equivalencias estructurales o en combinaciones de uno o varios de ellos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, uno o varios aparatos de procesamiento de datos pueden formar parte de un módulo que se puede instalar en un ordenador y configurarse para que ejecute algoritmos para seleccionar y/o detectar biomarcadores para enfermedades, así como ejecutar algoritmos para la clasificación de una o varias enfermedades. En algunas realizaciones, uno o varios aparatos de procesamiento de datos pueden ser parte de un módulo que puede estar instalado en un ordenador y estar configurado para realizar el algoritmo de clasificación presentado en el ejemplo 8, que incluye los bucles de iteración anidados (p. ej., bucle de biomarcadores y bucle de conjuntos de datos). Por ejemplo, se pueden configurar uno o varios aparatos de procesamiento de datos para que ejecuten una o varias de las operaciones mostradas en las figuras 21A y 21B. En algunas realizaciones, los algoritmos pueden estar implementados como uno o varios productos de programa informático, a saber, uno o varios módulos de instrucciones de programa informático codificados en un medio legible por ordenador para la ejecución mediante el aparato de procesamiento de datos o para el control de la operación del mismo.

El medio legible por ordenador puede ser un dispositivo de almacenamiento legible en una máquina, un sustrato de almacenamiento legible en una máquina, un dispositivo de memoria o una combinación de uno o varios de ellos. La terminología «aparato de procesamiento de datos» engloba cualquier aparato, dispositivo y máquina para el procesamiento de datos, entre ellos, a modo de ejemplo, un procesador programable, un ordenador o numerosos procesadores u ordenadores. El aparato puede incluir, además del equipo informático, un código que crea un entorno de ejecución para el programa informático en cuestión, p. ej., un código que constituya un microcódigo del procesador, una pila de protocolos, un sistema de administración de bases de datos, un sistema operativo, un entorno de ejecución o una combinación de uno o varios de ellos. El aparato incluye código para crear, verificar y/o modificar las tablas de la K-base o de la I-base. En algunas realizaciones, la K-base y la I-base se pueden mantener en un sistema de administración de bases de datos, tales como SQL para servidores, Oracle, MySQL, entre otros.

Un programa informático (también conocido como programa, soporte lógico, aplicación con soporte lógico, archivo de órdenes o código) se puede escribir en cualquier forma de lenguaje de programación, que incluye lenguajes compilados o interpretados, y se puede poner en funcionamiento en cualquier forma de implementación utilizada corrientemente, que presente una unidad idónea para ser usada en un entorno computacional. Un programa informático no se corresponde necesariamente con un archivo en un sistema de archivos. Un programa se puede almacenar en una porción de un archivo que contiene otros programas o datos (p. ej., uno o varios archivos de órdenes almacenados en un documento con lenguaje de análisis formal de documentos) en un solo archivo dedicado al programa en cuestión, o en varios archivos coordinados (p. ej., archivos que almacenan uno o varios módulos, subprogramas o porciones de código). Un programa informático se puede implementar para ser ejecutado en un ordenador o en varios ordenadores que están localizados en un sitio o distribuidos a través de muchos sitios e interconectados mediante una red de comunicación.

Los procesos descritos en esta especificación se pueden realizar mediante uno o varios procesadores que ejecutan uno o varios programas informáticos para realizar funciones al operar sobre datos de entrada y generar una salida. Los procesadores idóneos para ejecutar un programa informático incluyen, a modo de ejemplo, microprocesadores de propósito tanto general como especial, y uno o varios procesadores de cualquier clase de ordenador digital.

En algunas realizaciones, un usuario introduce a mano, a través de uno o varios dispositivos, los datos obtenidos de las pruebas de detección en la etapa de investigación o en la etapa clínica. En algunas realizaciones, un usuario puede observar o recibir, desde uno o varios dispositivos, los datos de salida, tales como, pero sin limitarse a ellos datos de clasificación de biomarcadores y datos relativos a las detecciones de los cambios de concentración de los biomarcadores. También se pueden utilizar otra clase de dispositivos para proporcionar la interacción con un usuario; por ejemplo, la retroalimentación proporcionada al usuario puede ser cualquier forma de retroalimentación sensitiva, p. ej., retroalimentación visual o retroalimentación auditiva; y la entrada que aporta el usuario se puede recibir en cualquier forma, entre ellas la entrada acústica, oral o táctil.

Las realizaciones del asunto importante descritas en esta especificación se pueden implementar en un sistema informático que incluye un componente interno de respaldo, p. ej., un servidor de datos, o que incluye un componente de programa intermedio, p. ej., un servidor de la aplicación, o que incluye un componente de interfaz, p. ej., un cliente computacional que tiene una interfaz gráfica de usuario o un navegador web a través del cual un usuario puede interactuar con una implementación del asunto importante descrito en esta especificación, o cualquier combinación de uno o varios de tales componentes internos de respaldo, programa intermedio o interfaz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema puede incluir una interfaz de usuario/interfaz web gráfica que permite a un usuario introducir y/o inspeccionar los datos de la K-base y de la I-base. Como alternativa, o además, la interfaz puede permitir al usuario controlar, modificar o manipular una ejecución del algoritmo. En algunas realizaciones, el sistema puede recuperar o extraer datos de otros sistemas y/o componentes conectados a la red.

La presente invención no ve limitado su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. De hecho, diferentes modificaciones de la invención, además de las descritas en la presente memoria, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Se pretende que tales modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección en un sujeto para determinar si cualquiera o todos los siguientes sistemas de órganos: el aparato digestivo (GI), el aparato respiratorio y el sistema nervioso central, tienen una enfermedad, en donde dicho método comprende:

a. medir la concentración de los miRNA que son abundantes en el aparato digestivo (GI), de los miRNA que son abundantes en el aparato respiratorio y de los miRNA que son abundantes en el sistema nervioso central, en una muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

b. medir la concentración de los miRNA normalizadores en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

c. calcular las razones de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a) y (b);

d. comparar las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (c) con las correspondientes razones de control, y

e. (i) identificar que el sujeto está afectado por una enfermedad de un sistema de órganos determinado cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho sistema de órganos por sus correspondientes miRNA normalizadores, calculadas en la etapa (c), son más altas que las correspondientes razones de control, o (ii) identificar que el sujeto no está afectado por una enfermedad de dicho sistema de órganos cuando las razones de las concentraciones de los miRNA abundantes en dicho sistema de órganos por sus correspondientes miRNA normalizadores, calculadas en la etapa (c), no son más altas que las correspondientes razones de control,

en donde los miRNA abundantes en el aparato digestivo medidos en la etapa (a) comprenden miR-215, miR-203, miR-192 o miR-194, y los miRNA normalizadores de la etapa (b) comprenden miR-30e-3p, miR-145 o miR-148a;

los miRNA abundantes en el aparato respiratorio medidos en la etapa (a) comprenden miR-486-5p, miR-34b o miR-192, y los miRNA normalizadores de la etapa (b) comprenden miR-142-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-223, miR-409-3p;

y los miRNA abundantes en el sistema nervioso central medidos en la etapa (a) comprenden miR-128, miR-132 o miR-874 y los miRNA normalizadores de la etapa (b) comprenden miR-9, miR-181a, miR-491-5p, miR-141, o los miRNA abundantes en el sistema nervioso central medidos en la etapa (a) comprenden miR-134, miR-323-3p o miR-382, y los miRNA normalizadores de la etapa (b) comprenden miR-127 o miR-370.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende medir los miRNA abundantes en al menos un sistema de órganos adicional seleccionado del grupo que consiste en aparato locomotor, aparato circulatorio, aparato reproductor (femenino), sistema endocrino y sistema hemático.

3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que además comprende identificar si la enfermedad es cáncer o inflamación, en donde dicho método comprende:

a. medir la concentración de al menos un miRNA asociado al cáncer en una muestra de líquido corporal recogida del sujeto, en donde dicho miRNA asociado al cáncer se selecciona preferiblemente de los miRNA recogidos en la tabla 3;

b. medir la concentración de al menos un miRNA asociado a la inflamación en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto, en donde el miRNA asociado a la inflamación se selecciona preferiblemente de los miRNA recogidos en la tabla 3;

c. medir la concentración de al menos un miRNA abundante en el sistema de órganos implicado, en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

d. medir la concentración de al menos un miRNA normalizador en la misma muestra de líquido corporal recogida del sujeto;

e. calcular las razones emparejadas de las concentraciones de los miRNA medidas en las etapas (a), (b), (c) y (d);

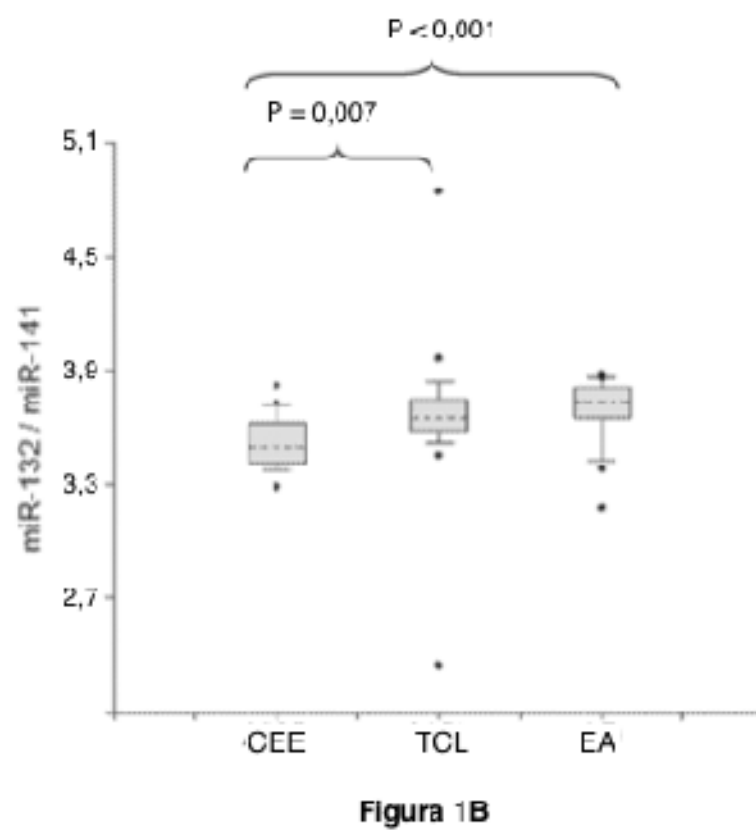
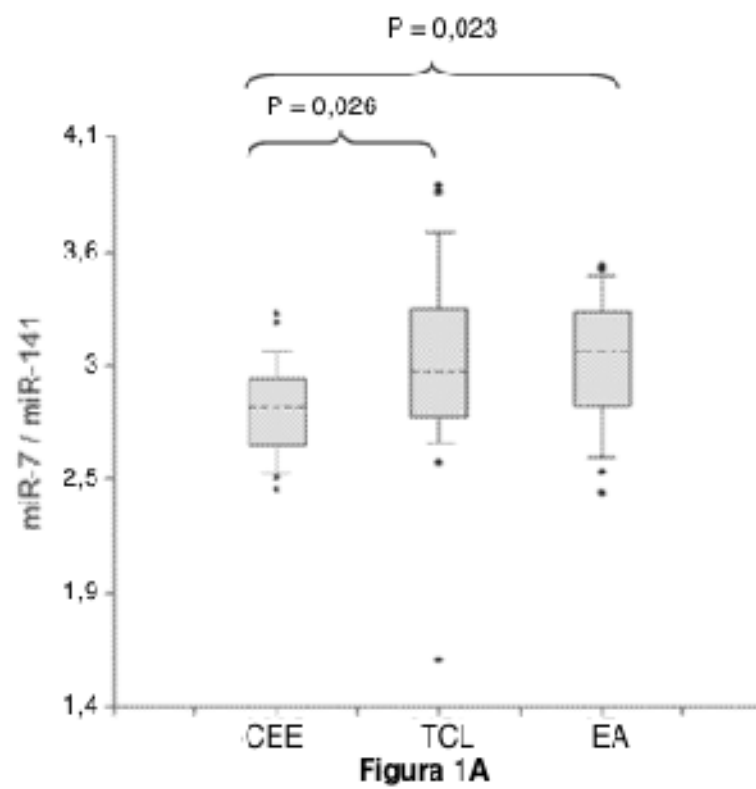
f. comparar las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (e) con las correspondientes razones predeterminadas características del cáncer y de la inflamación, y

g. (i) identificar que la enfermedad es cáncer cuando las razones de las concentraciones de los miRNA

calculadas en la etapa (e) están en el margen predeterminado característico del cáncer, o (ii) identificar que la enfermedad es inflamación cuando las razones de las concentraciones de los miRNA calculadas en la etapa (e) están en el margen predeterminado característico de la inflamación.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde

- 5 (1) la enfermedad está relacionada con el pulmón y las parejas de miRNA se seleccionan de las recogidas en la tabla 6, o
- (2) la enfermedad está relacionada con el aparato digestivo (GI) y las parejas de miRNA se seleccionan de las recogidas en la tabla 8, o
- 10 (3) la enfermedad está relacionada con el aparato respiratorio o el aparato digestivo (GI), y las parejas de miRNA se seleccionan de las recogidas en la tabla 11.



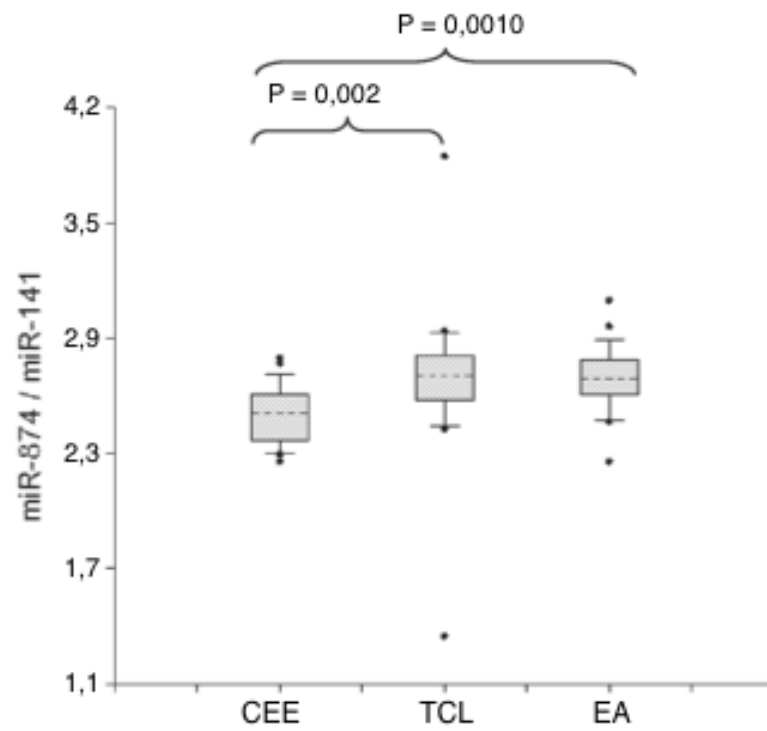


Figura 1C

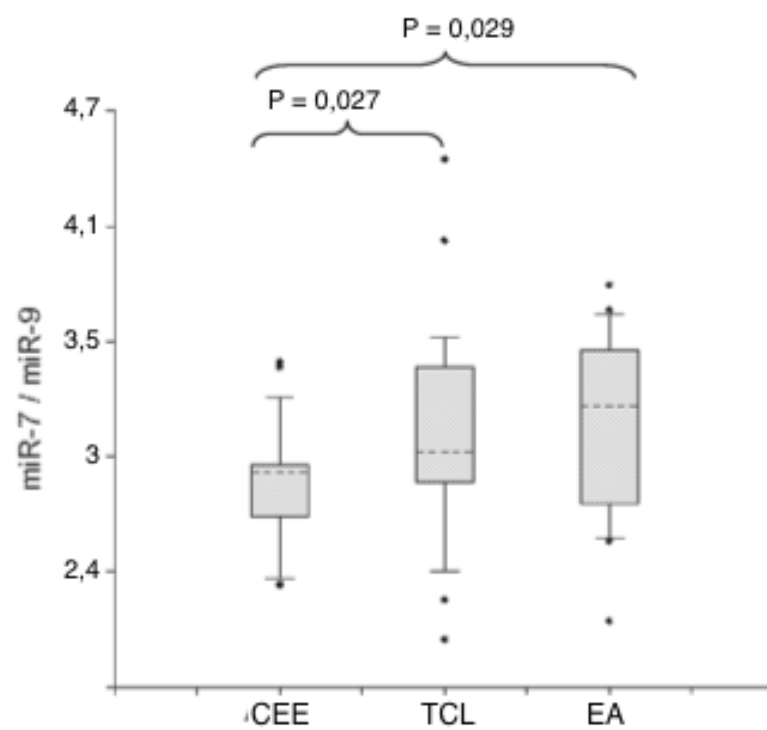


Figura 2A

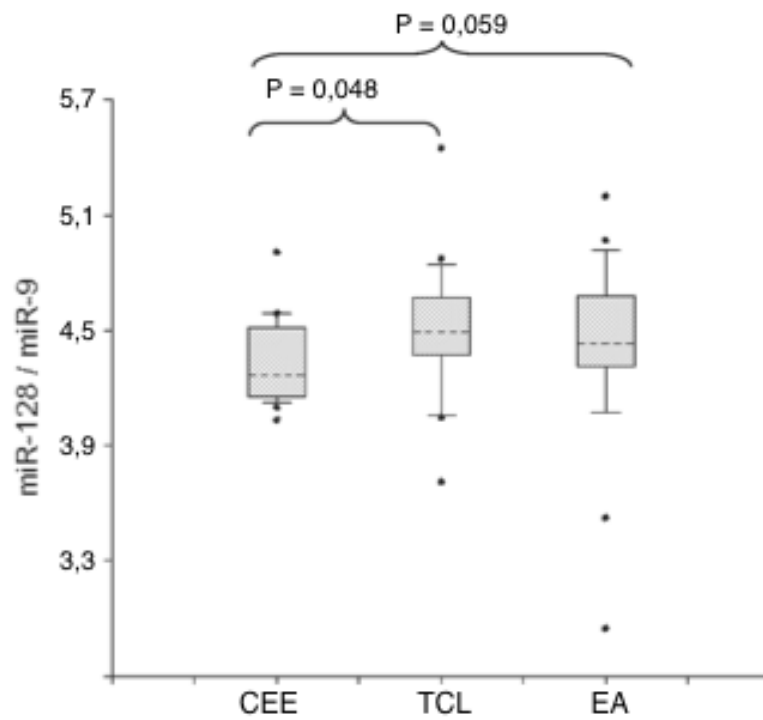


Figura 2B

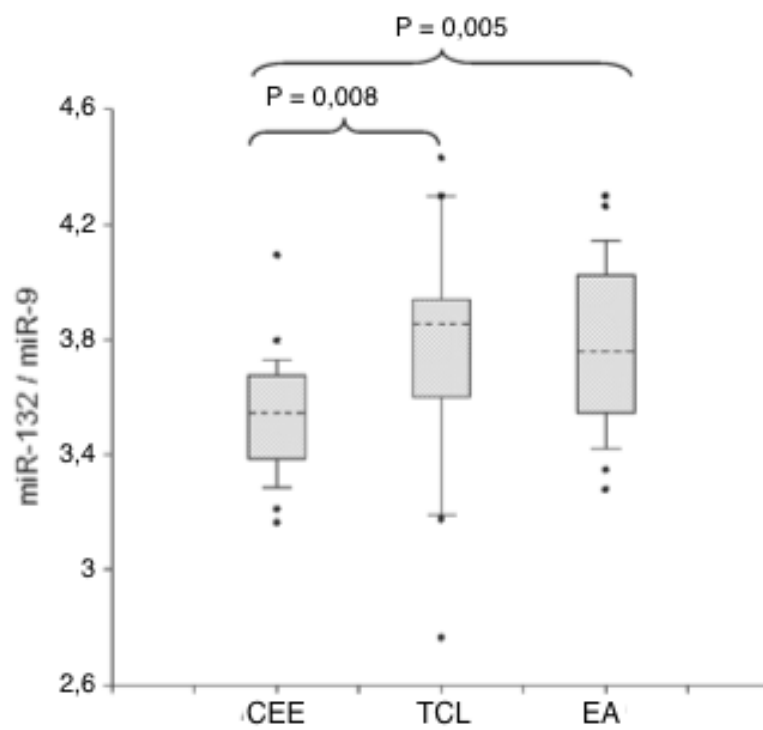


Figura 2C

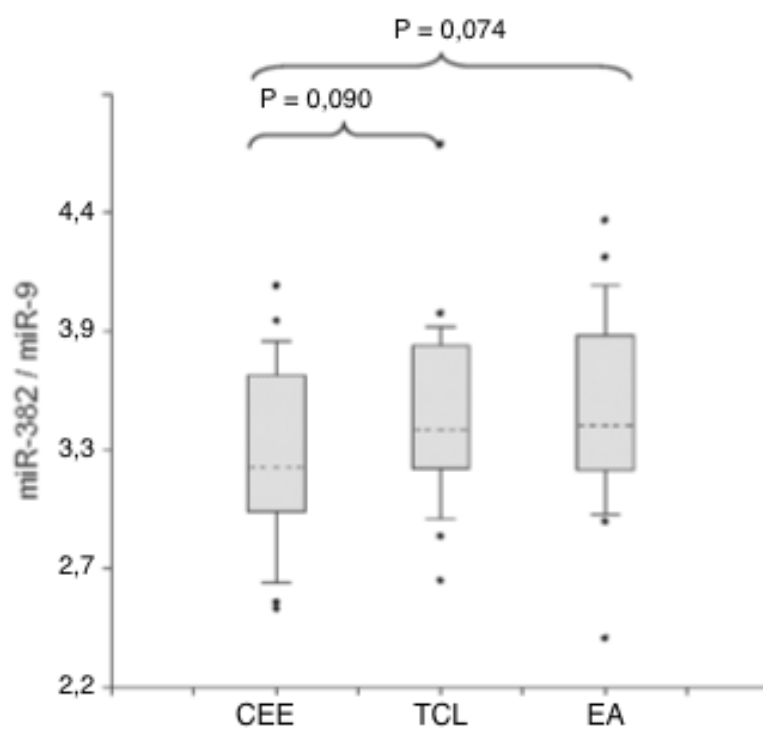


Figura 2D

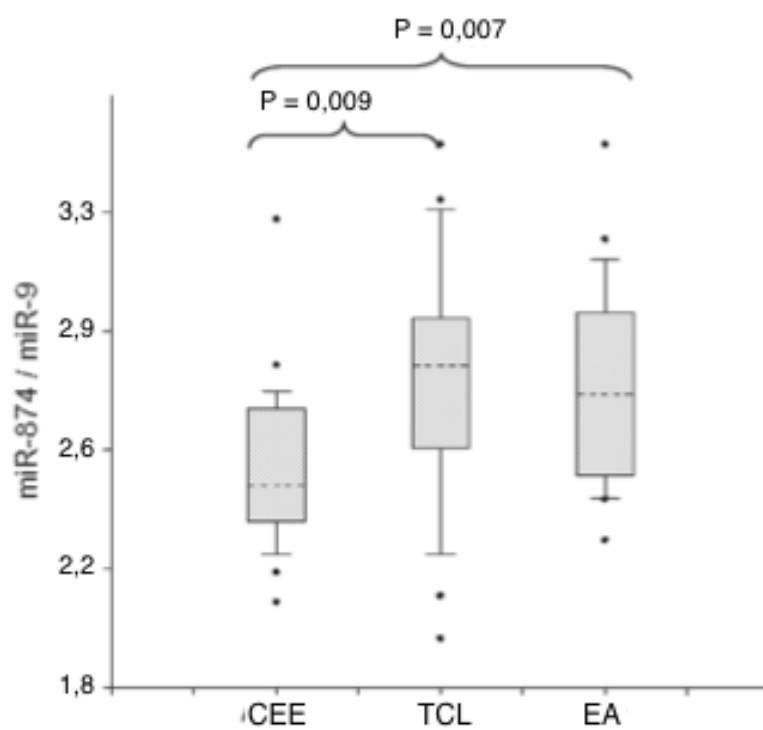


Figura 2E

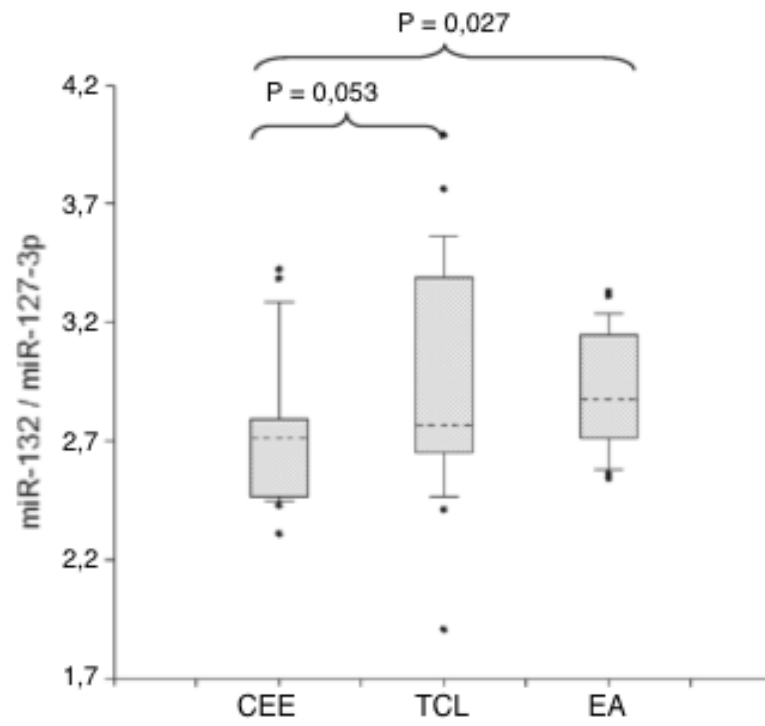


Figura 3A

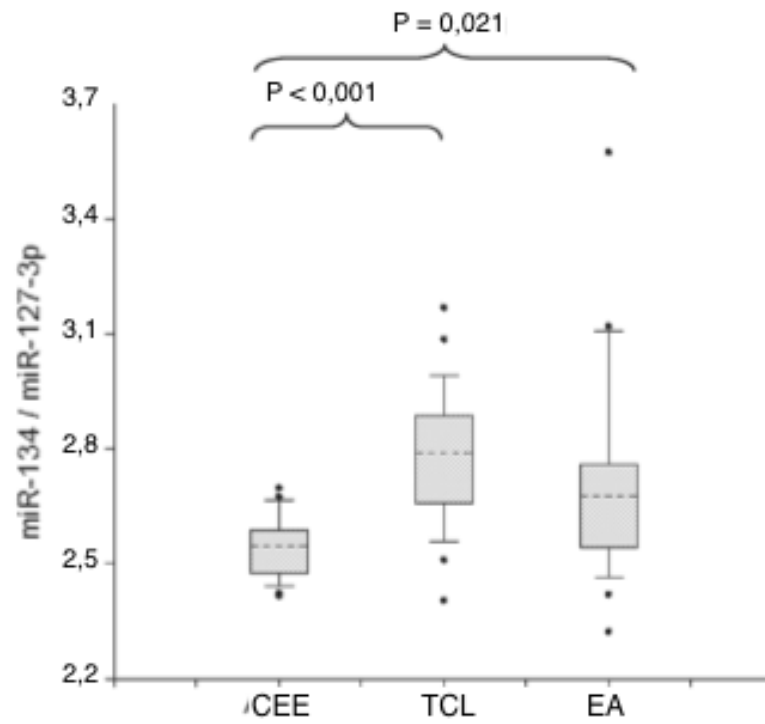


Figura 3B

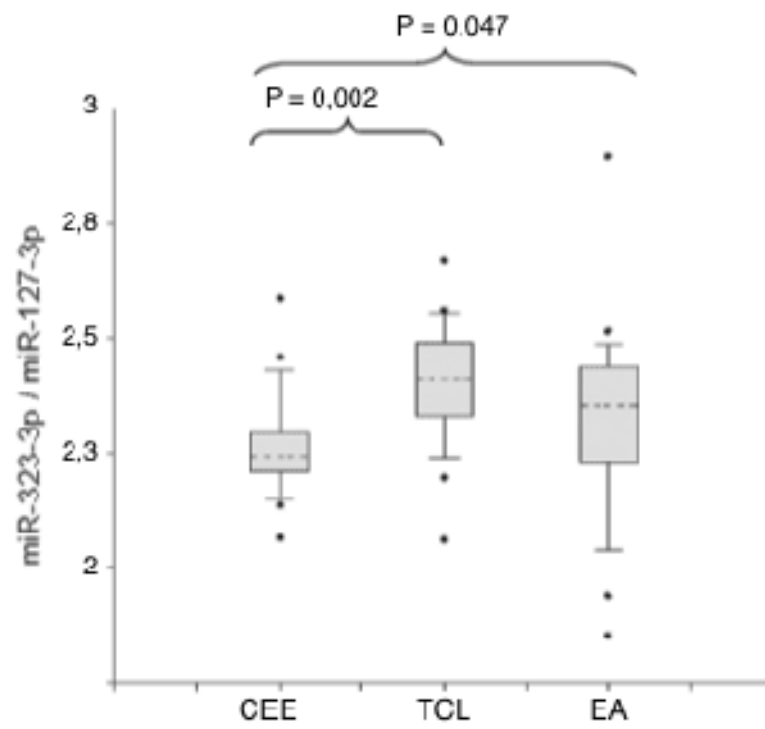


Figura 3C

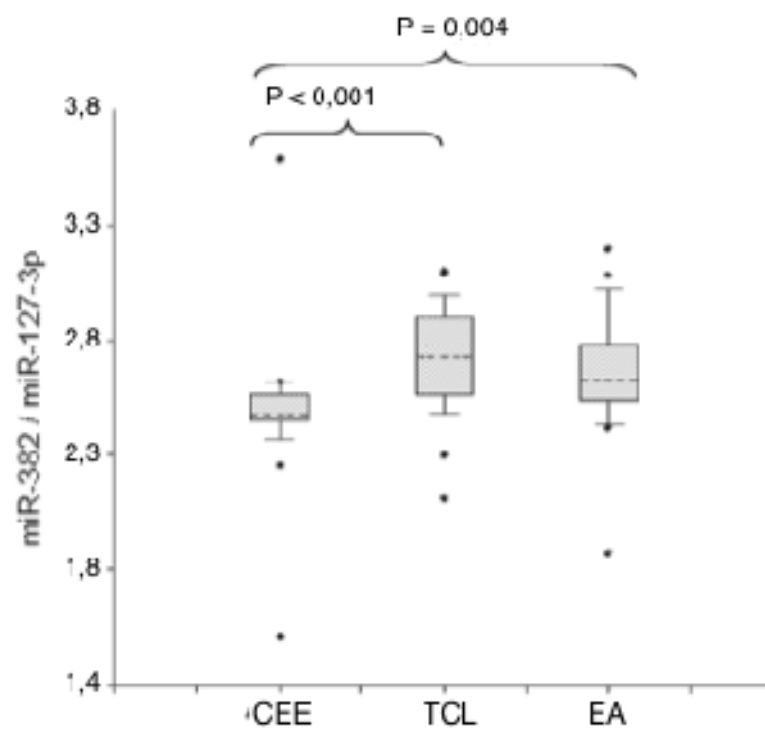


Figura 3D

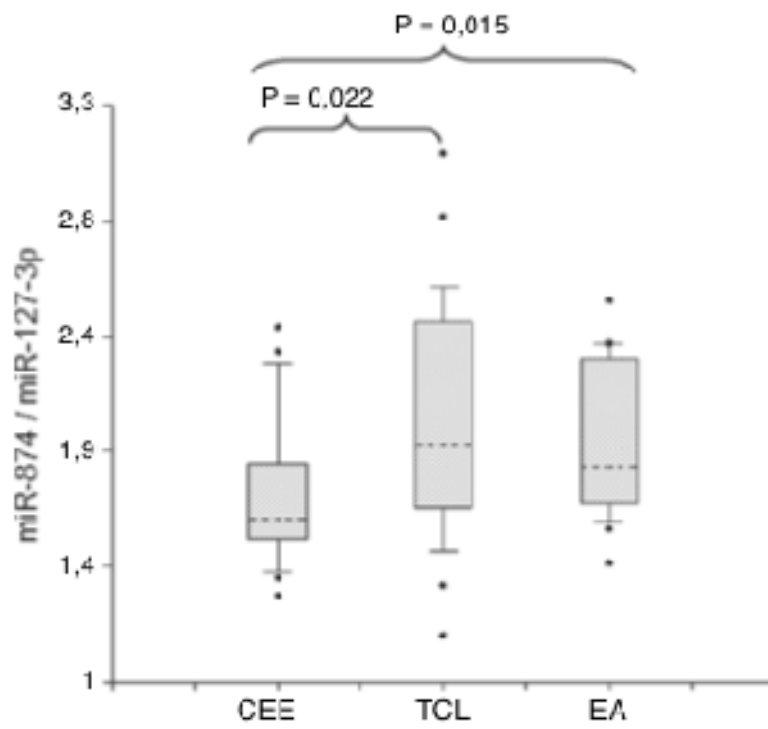


Figura 3E

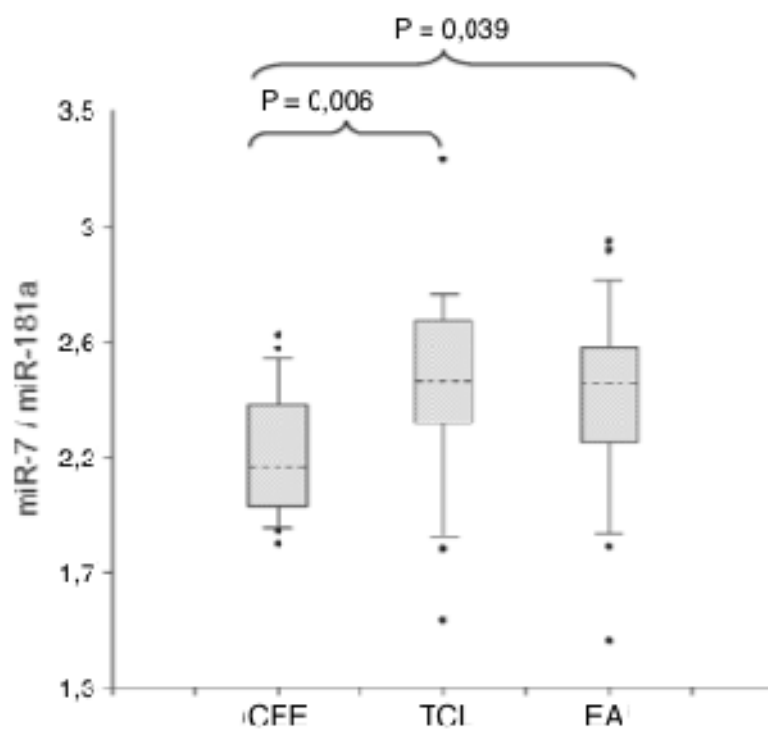


Figura 4A

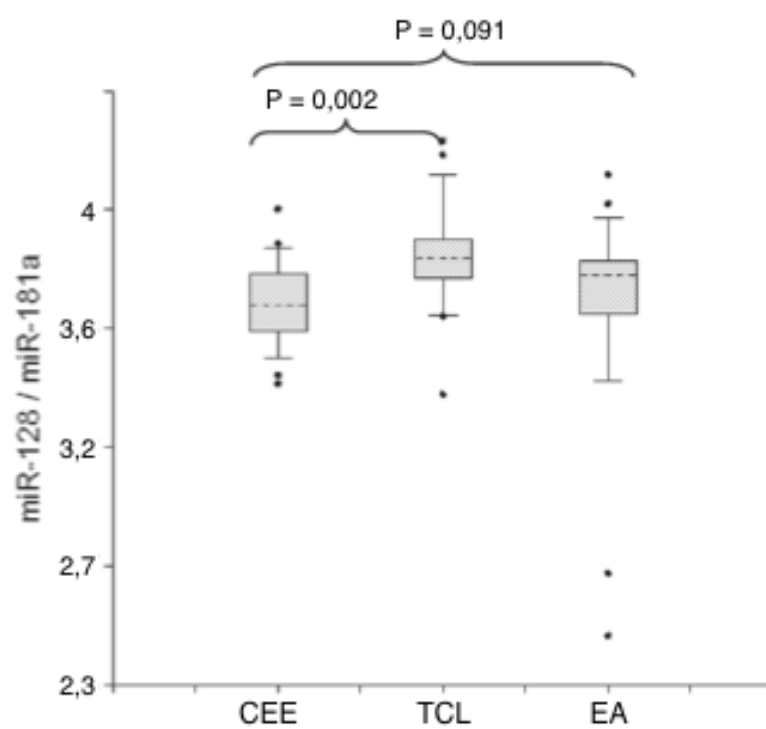


Figura 4B

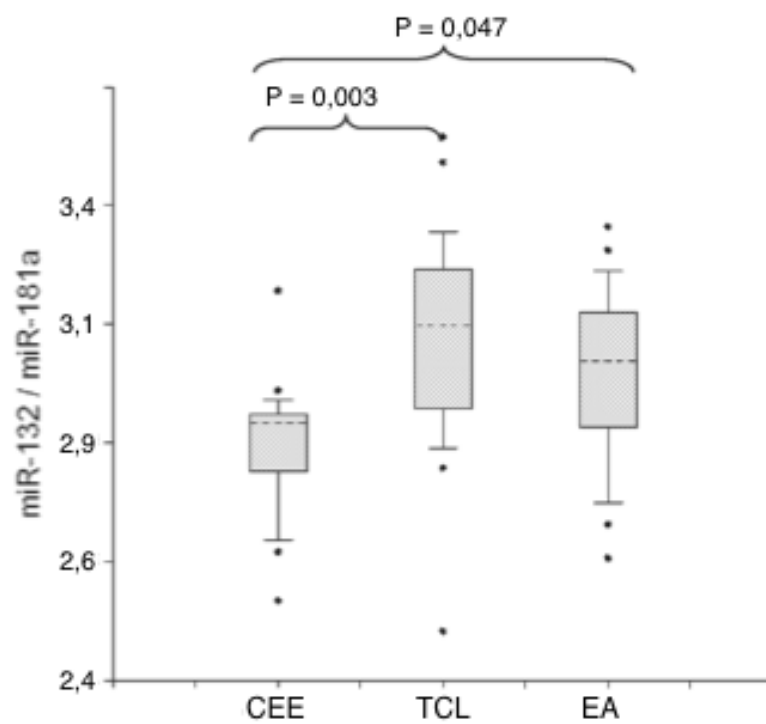


Figura 4C

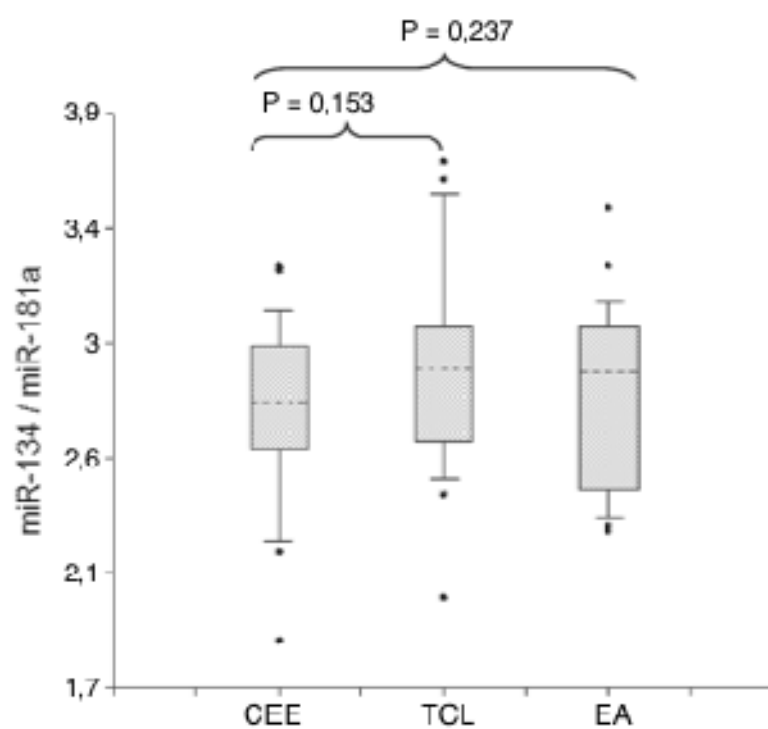


Figura 4D

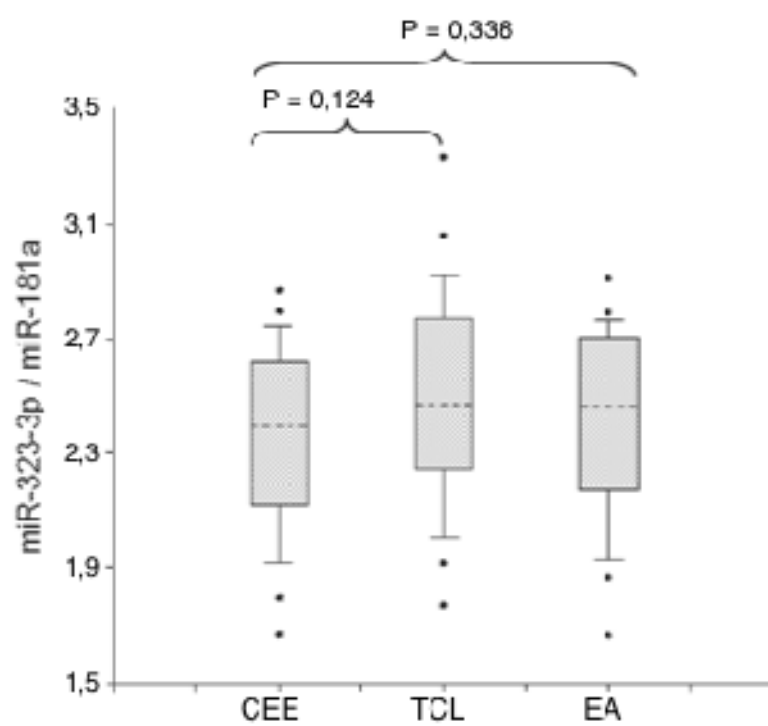


Figura 4E

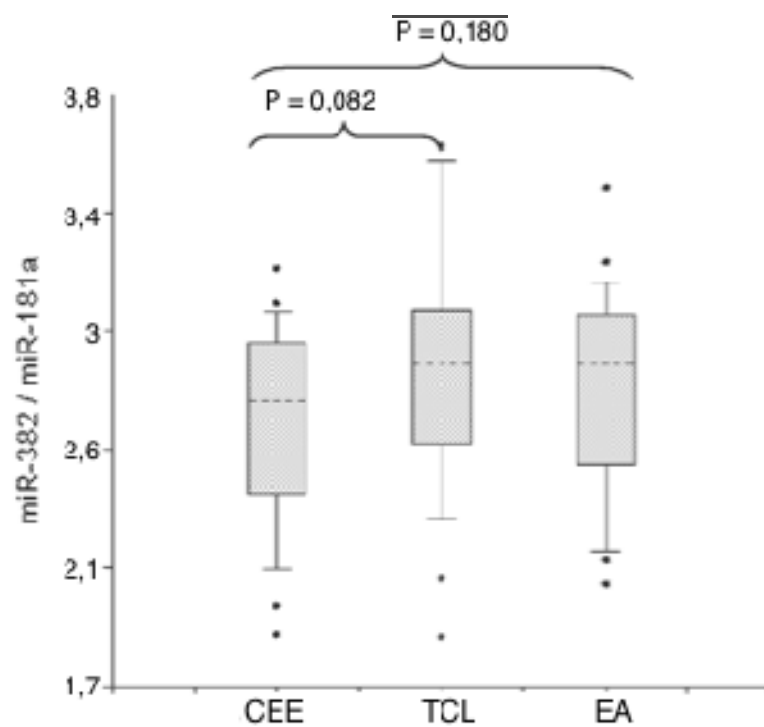


Figura 4F

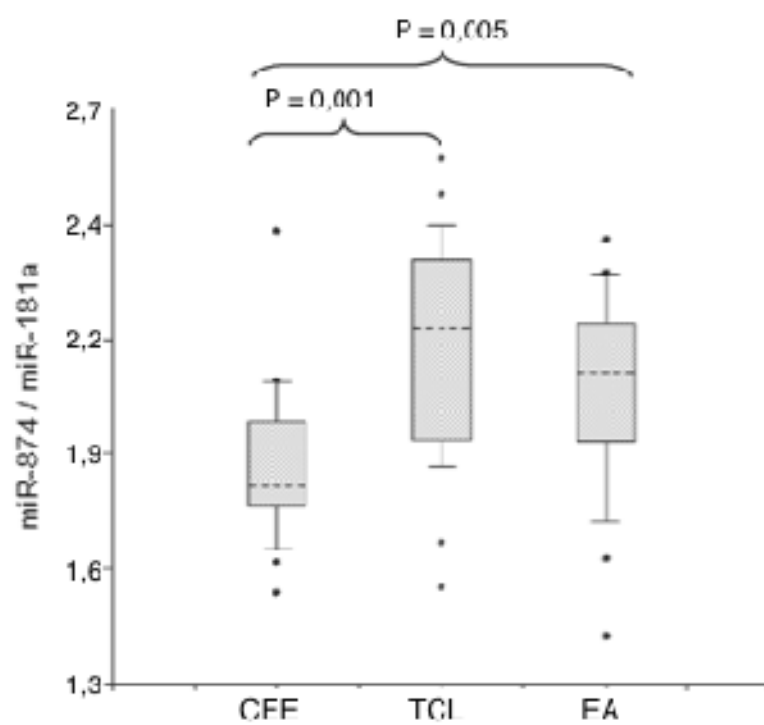


Figura 4G

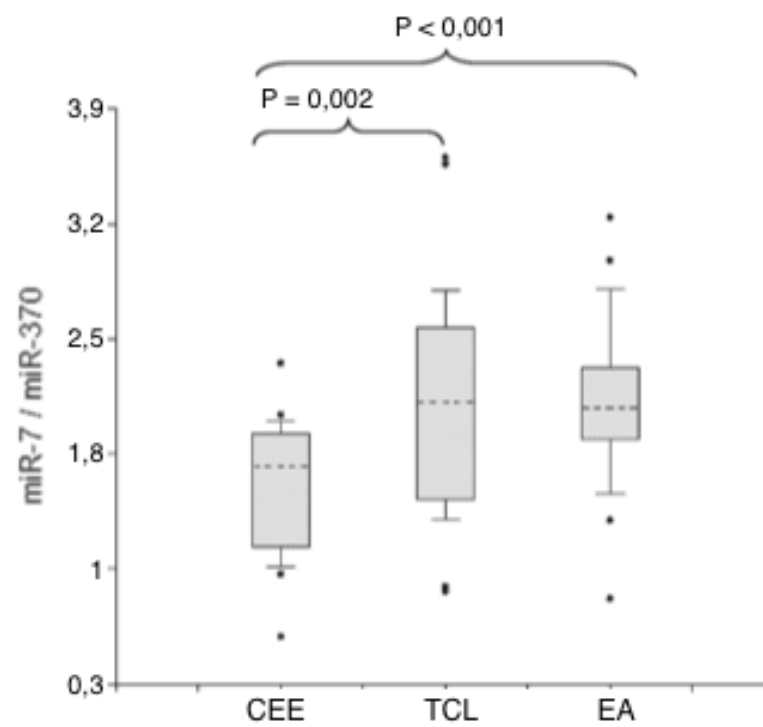


Figura 5A

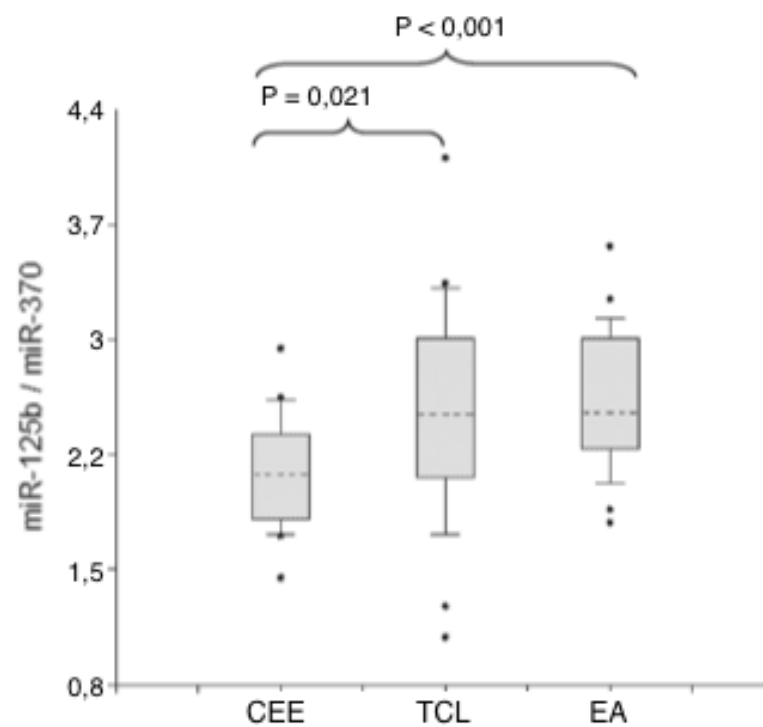


Figura 5B

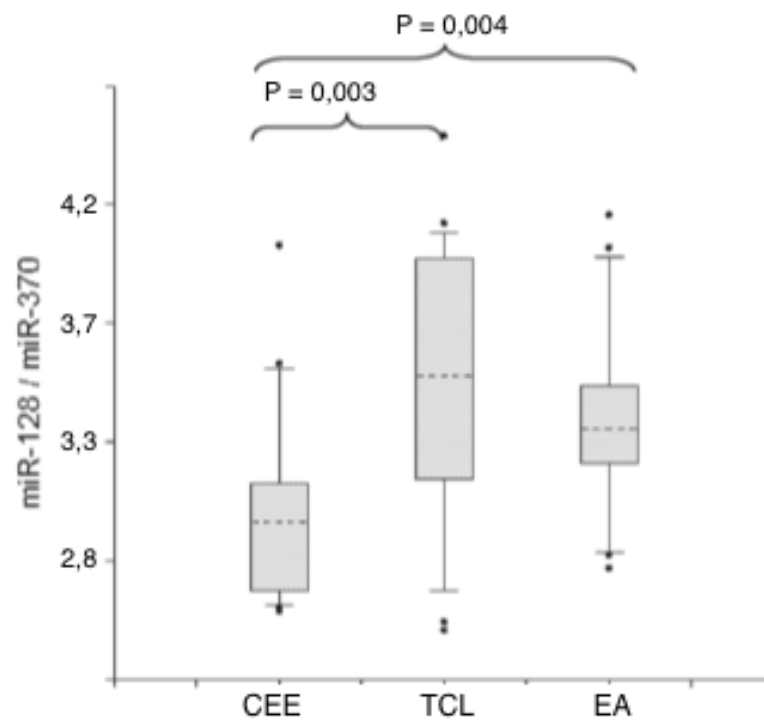


Figura 5C

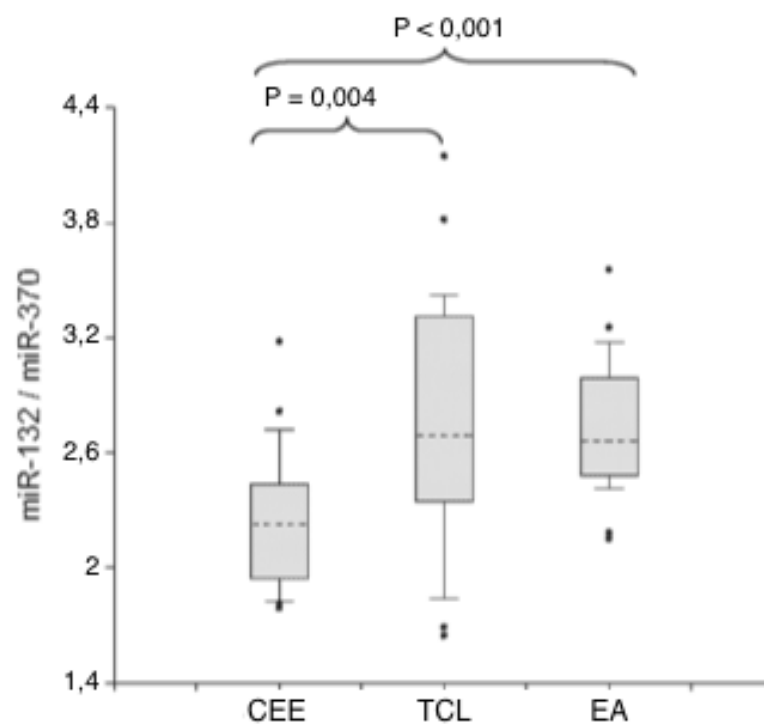


Figura 5D

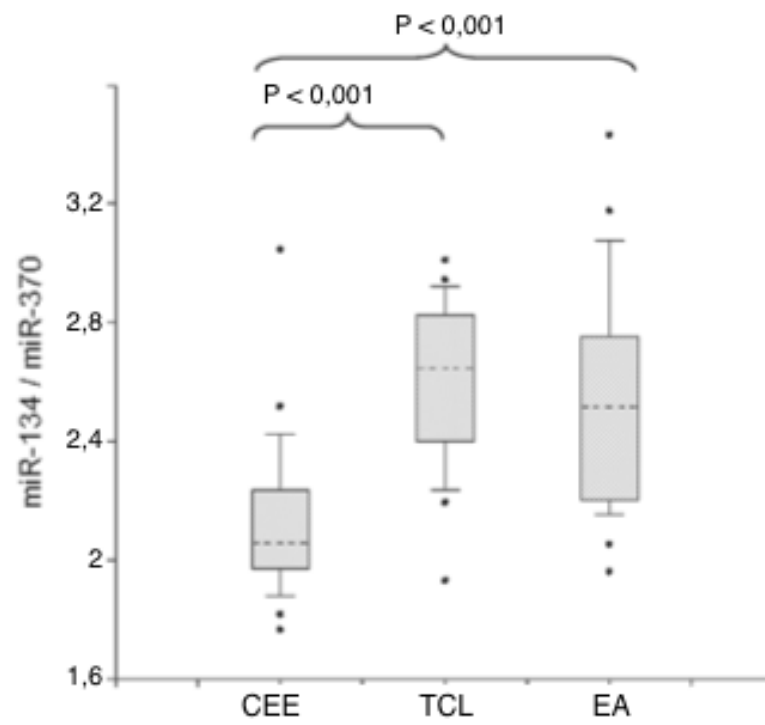


Figura 5E

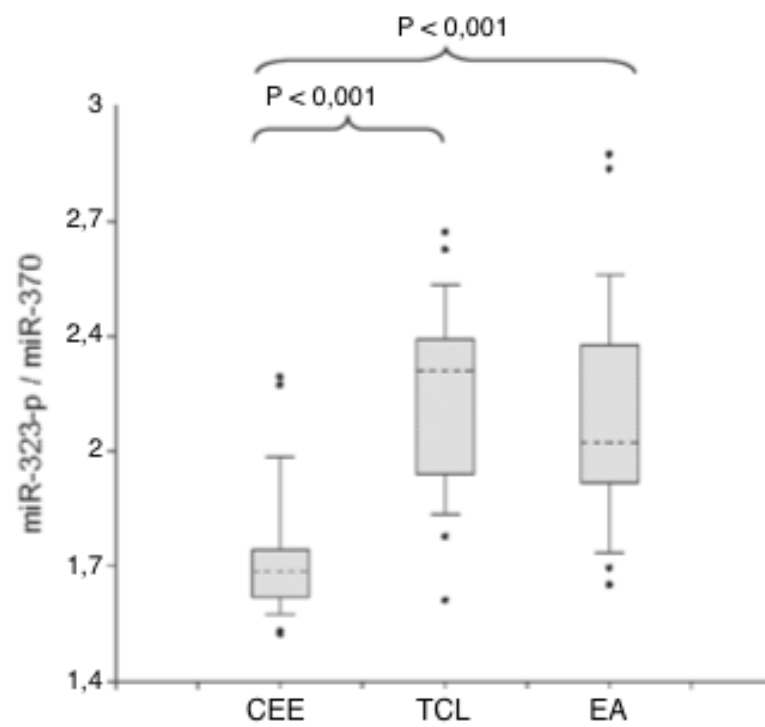


Figura 5F

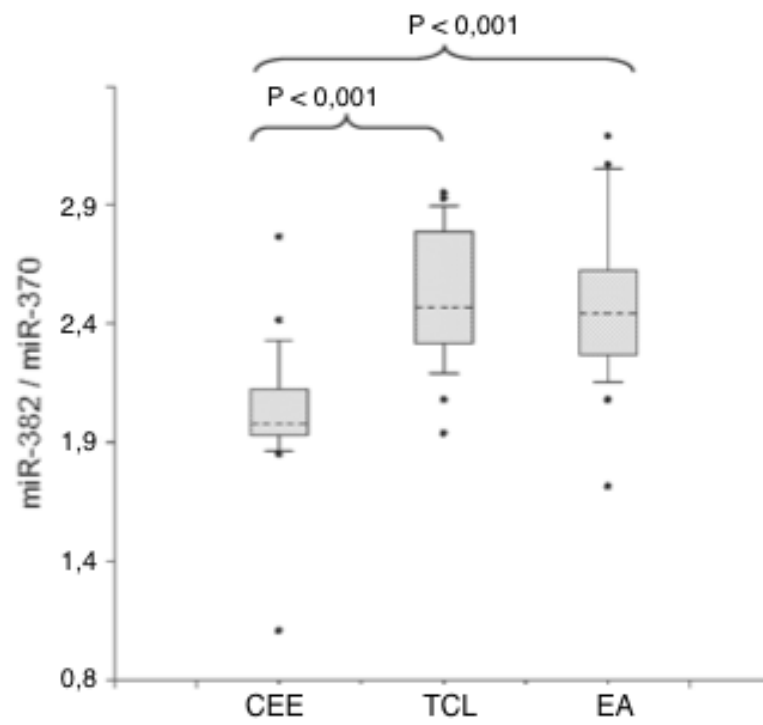


Figura 5G

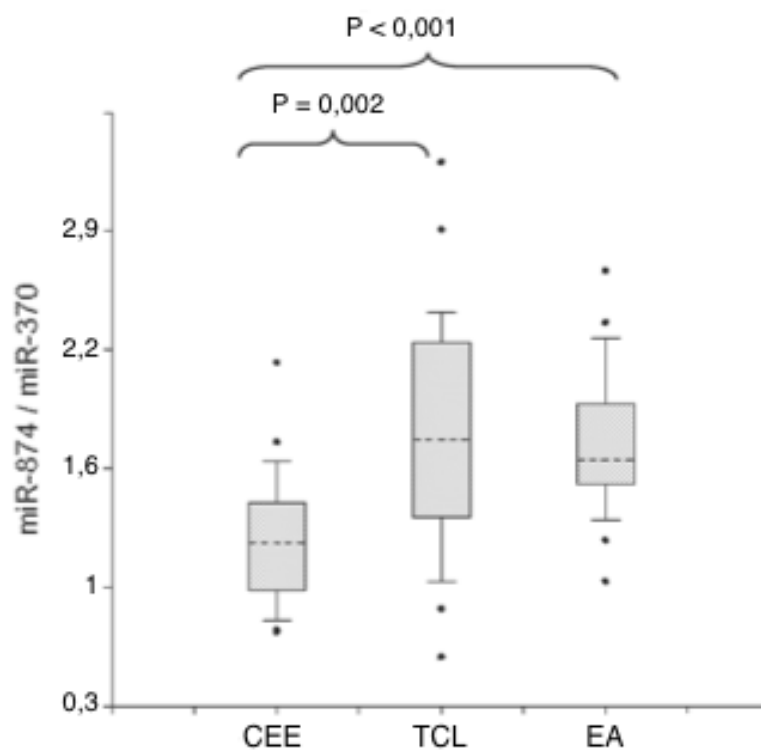


Figura 5H

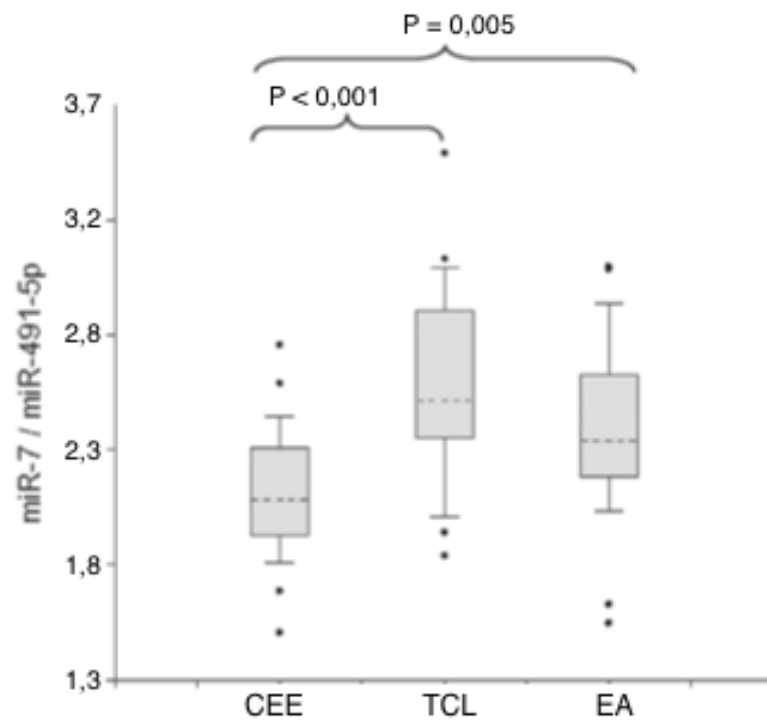


Figura 6A

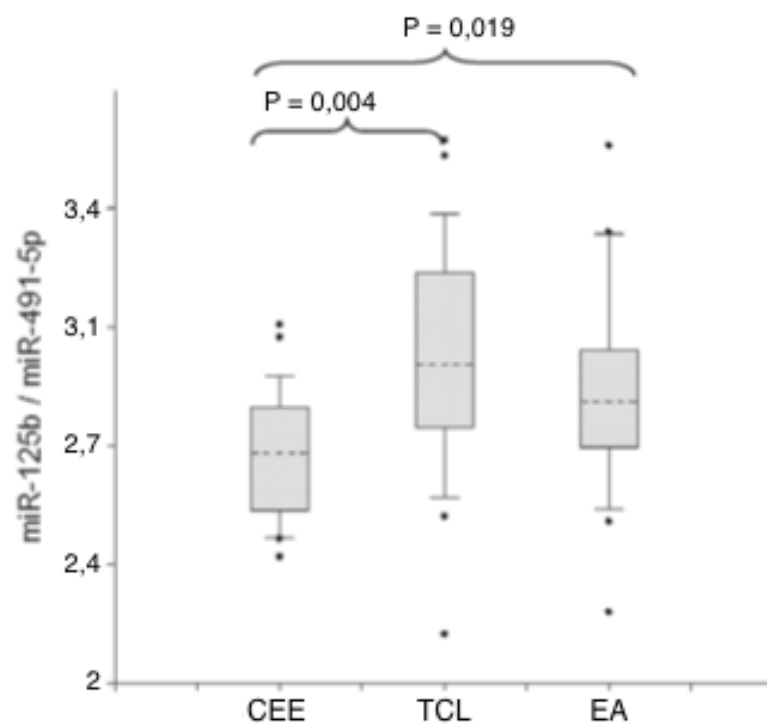


Figura 6B

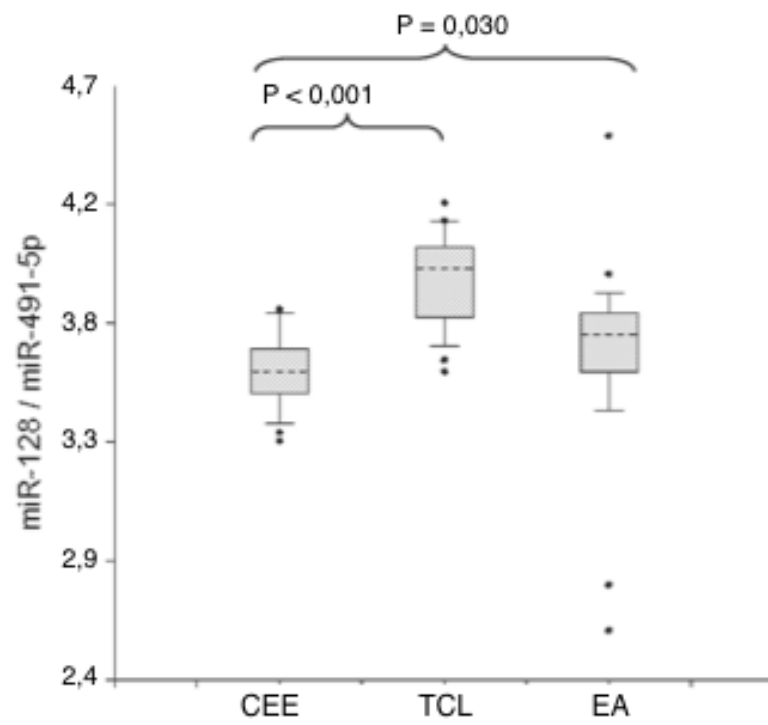


Figura 6C

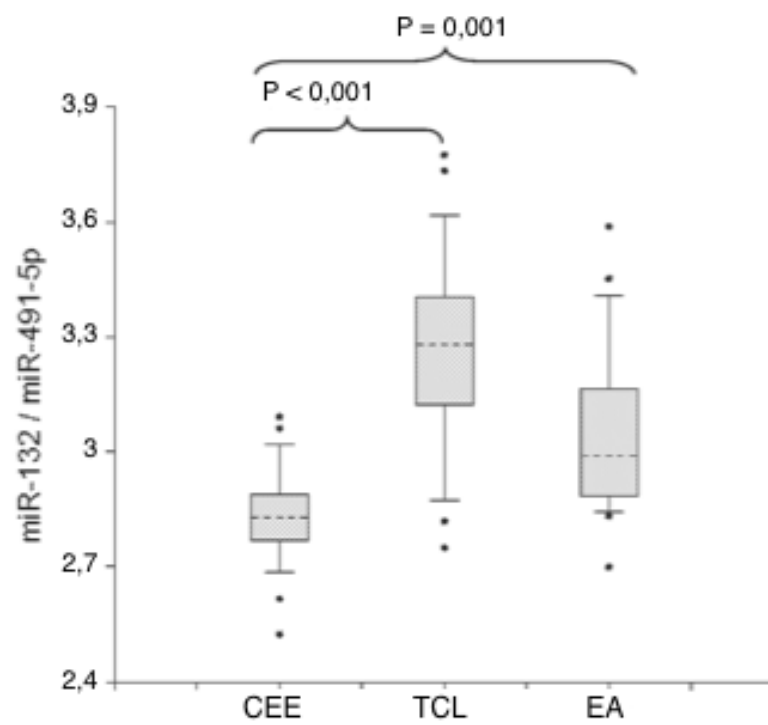


Figura 6D

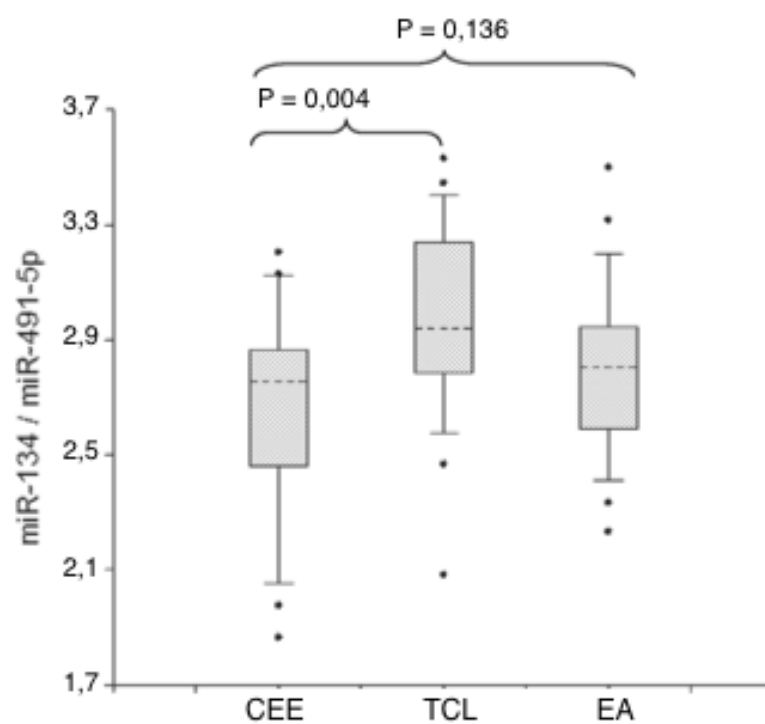


Figura 6E

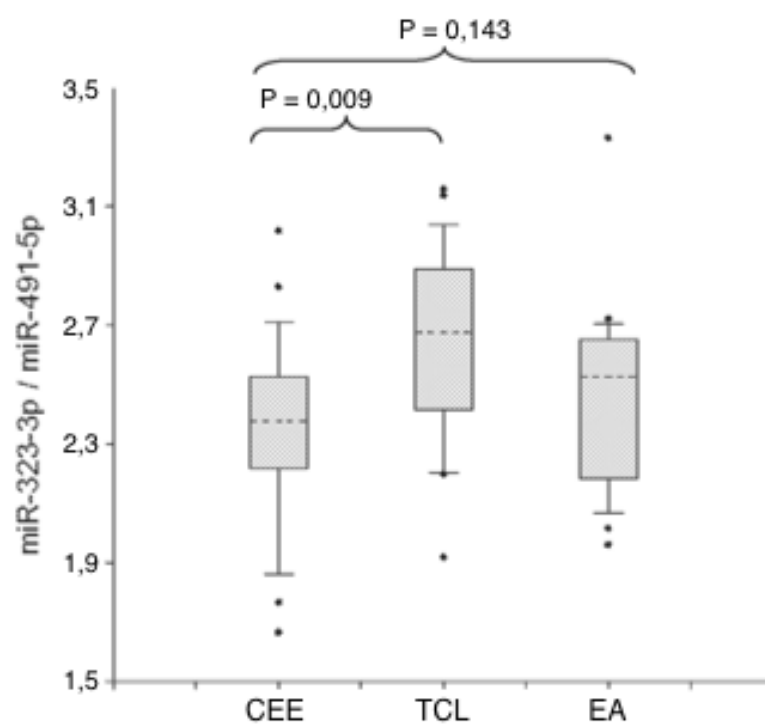


Figura 6F

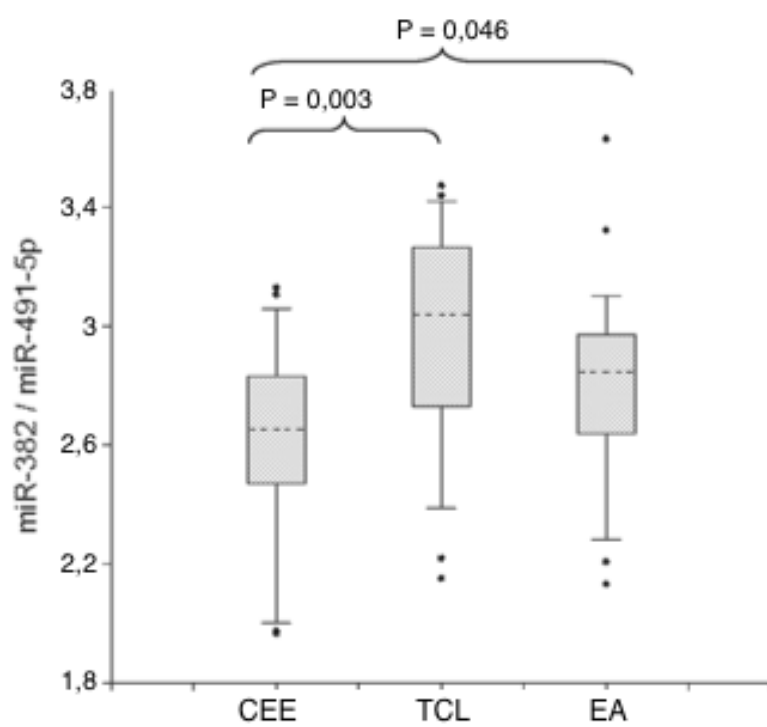


Figura 6G

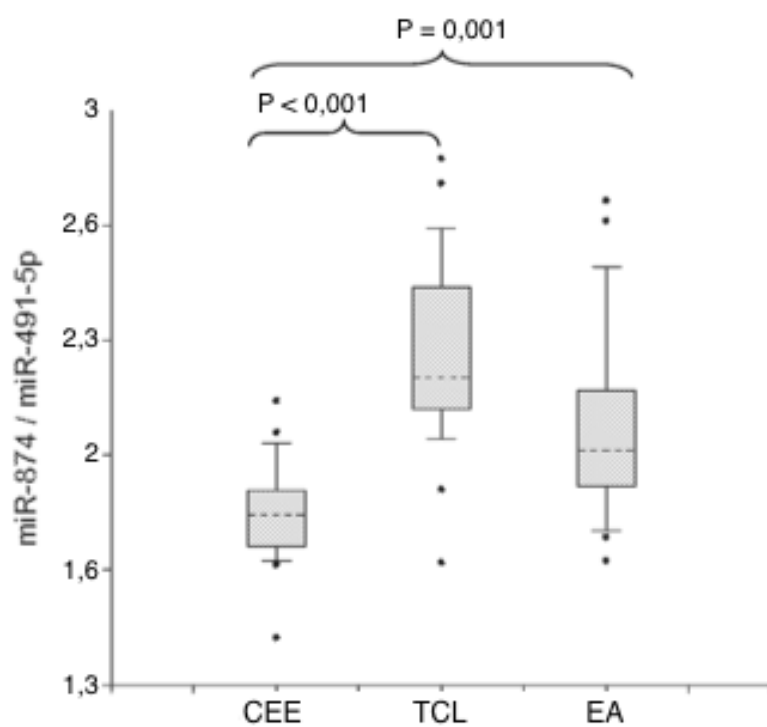


Figura 6H

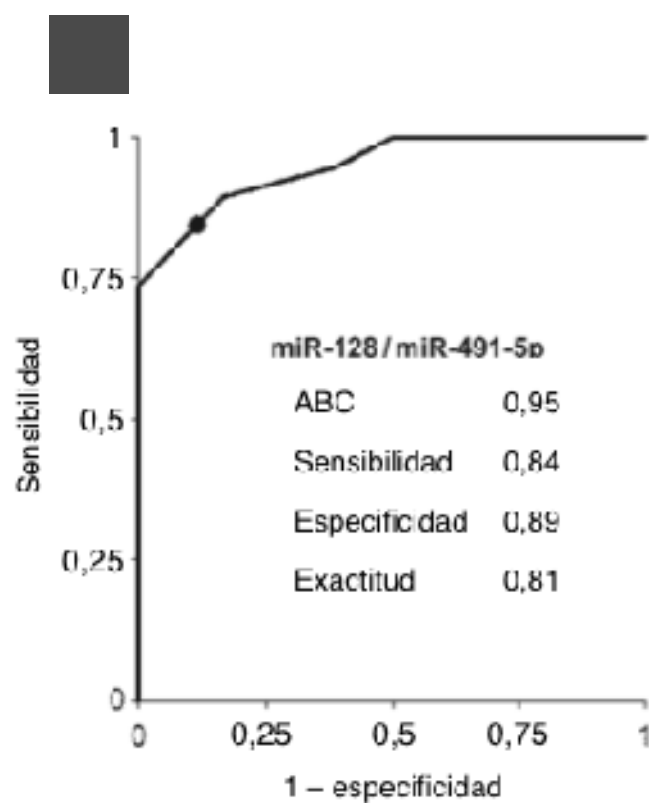


Figura 7A

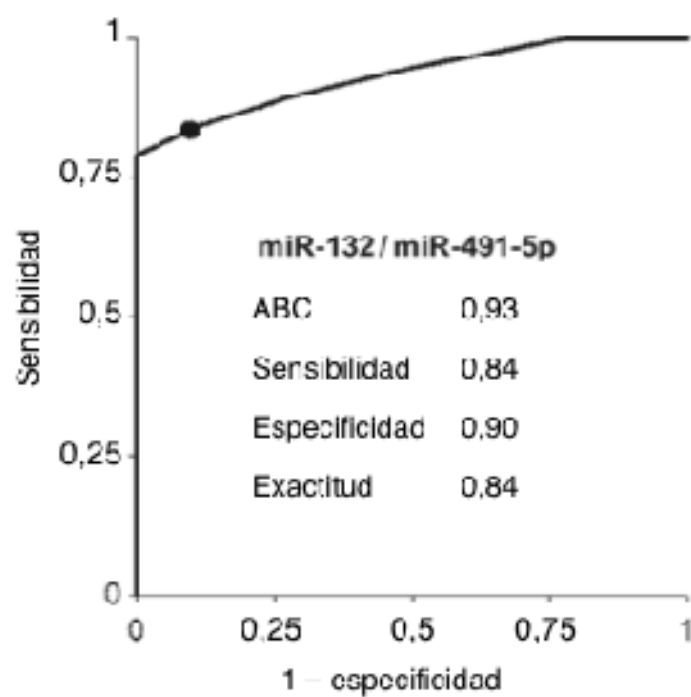


Figura 7B

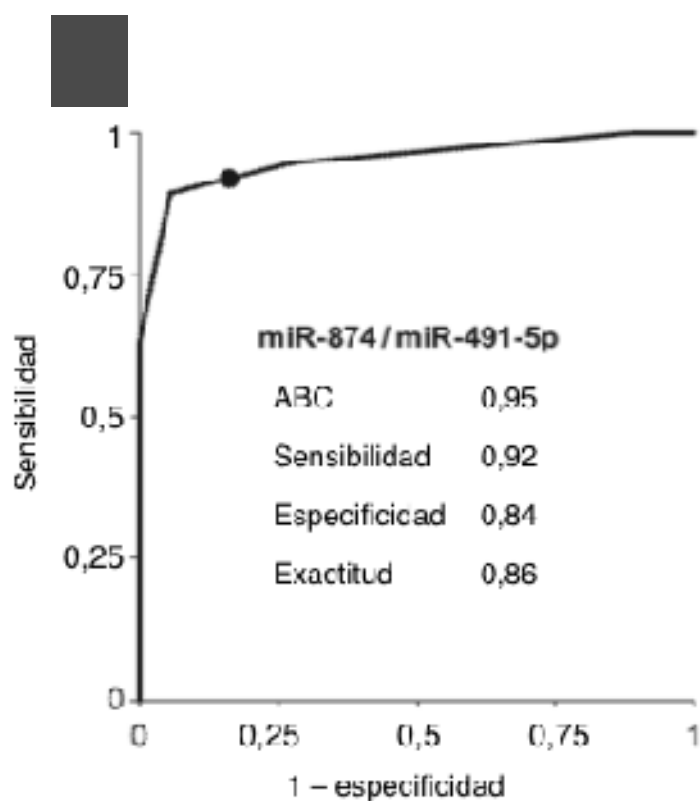


Figura 7C

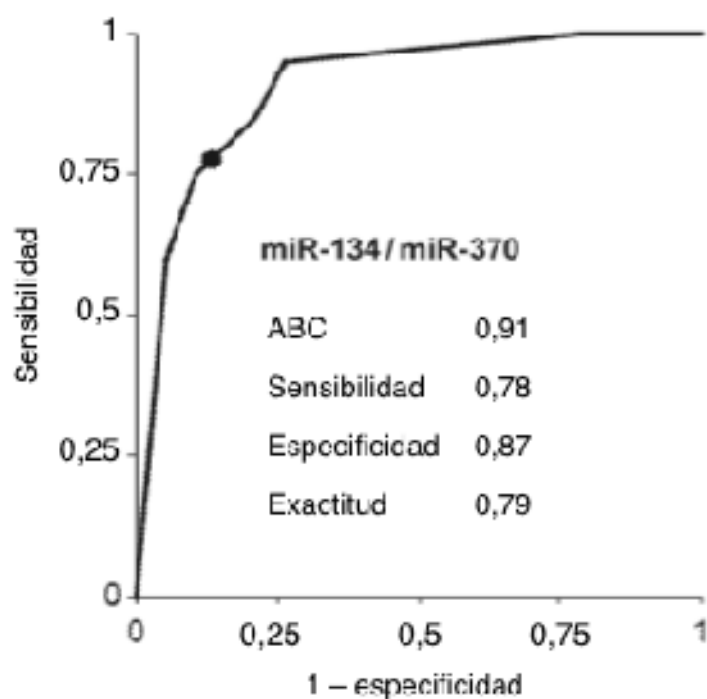


Figura 8A

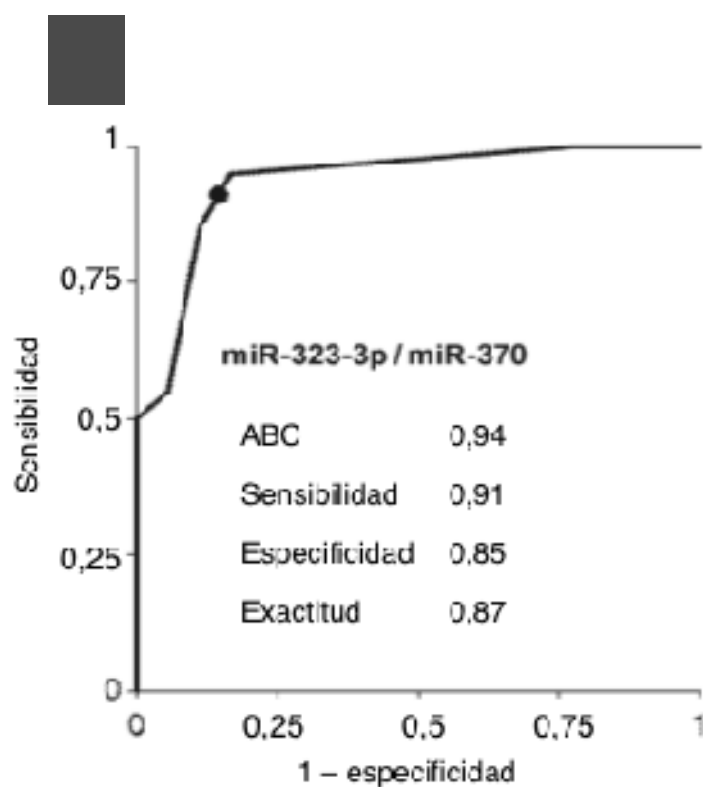


Figura 8B

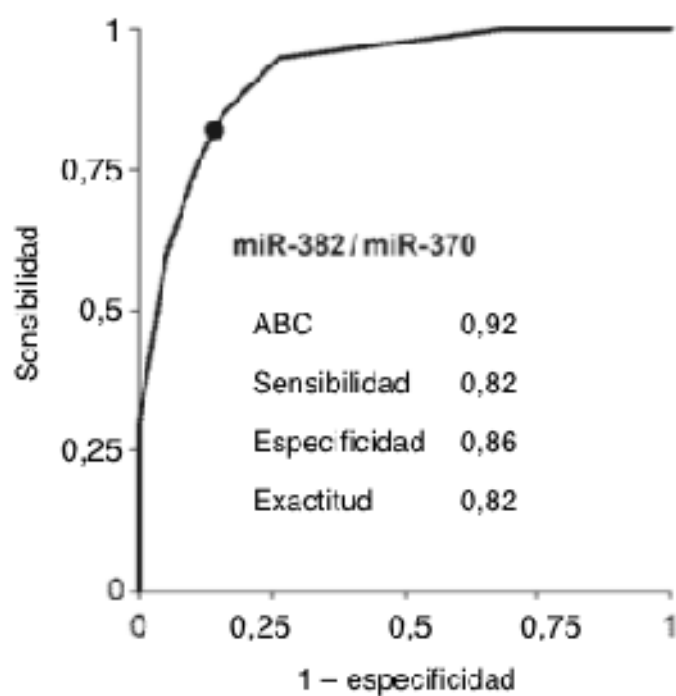


Figura 8C

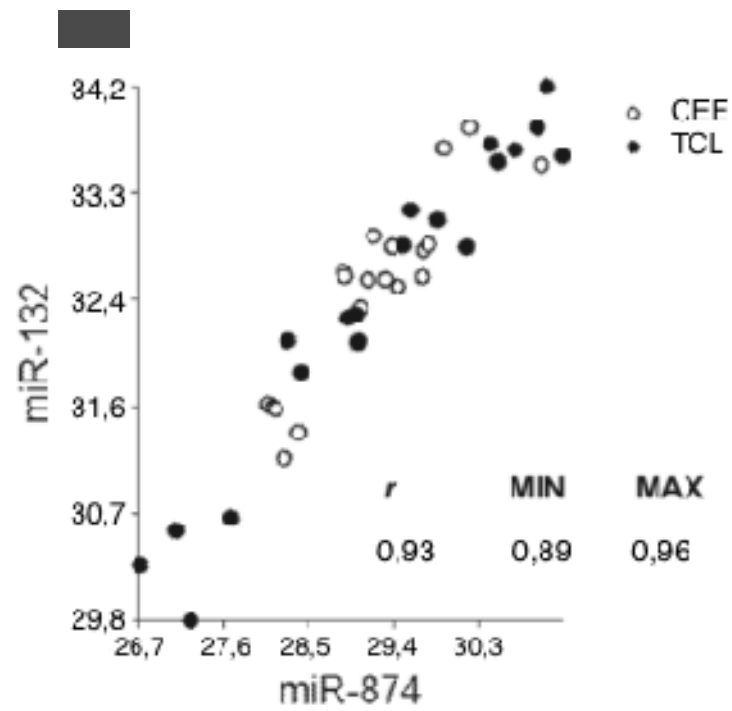


Figura 9C

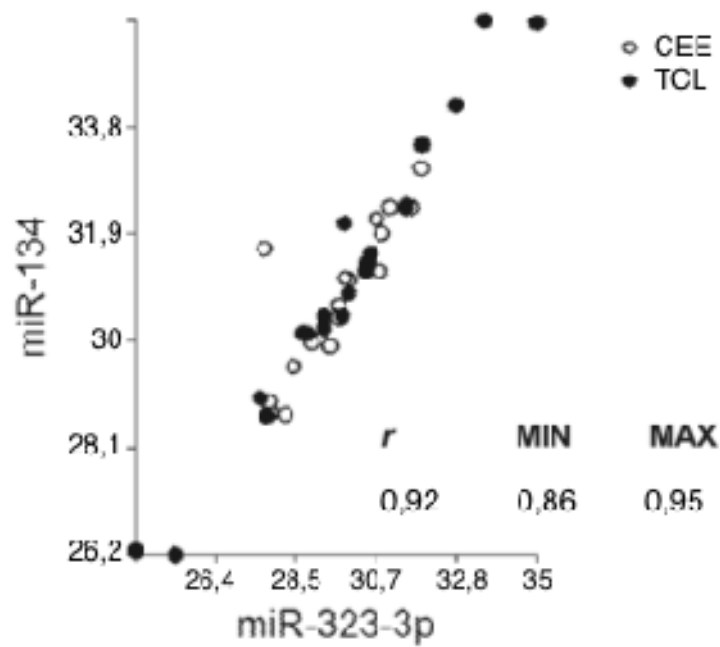


Figura 9D

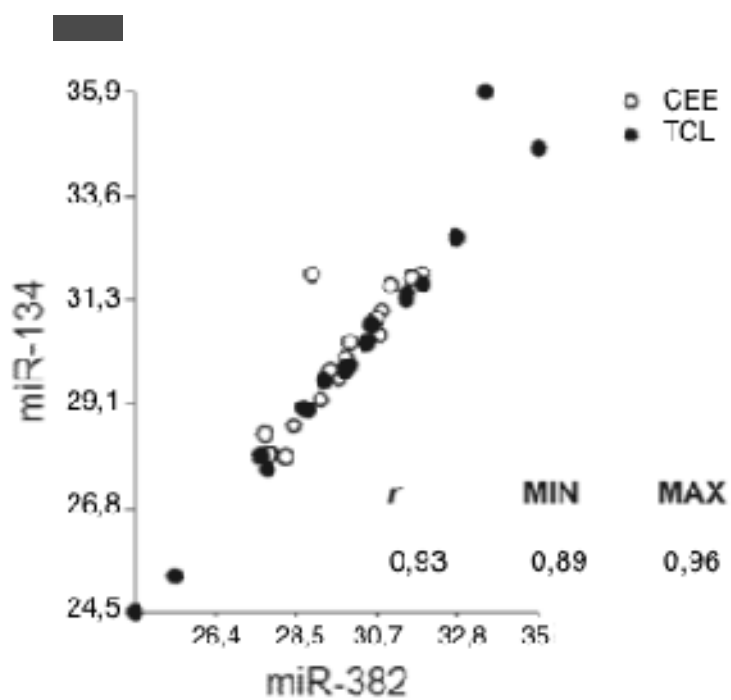


Figura 9E

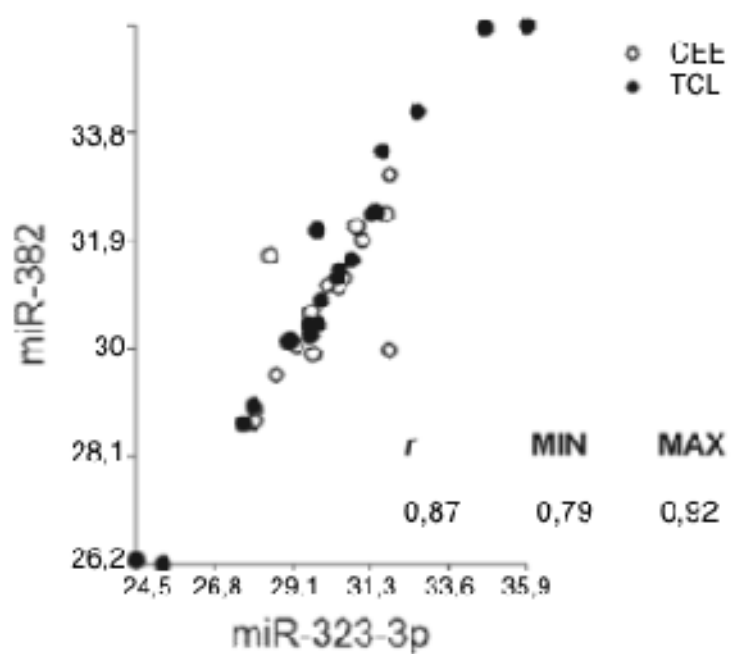


Figura 9F

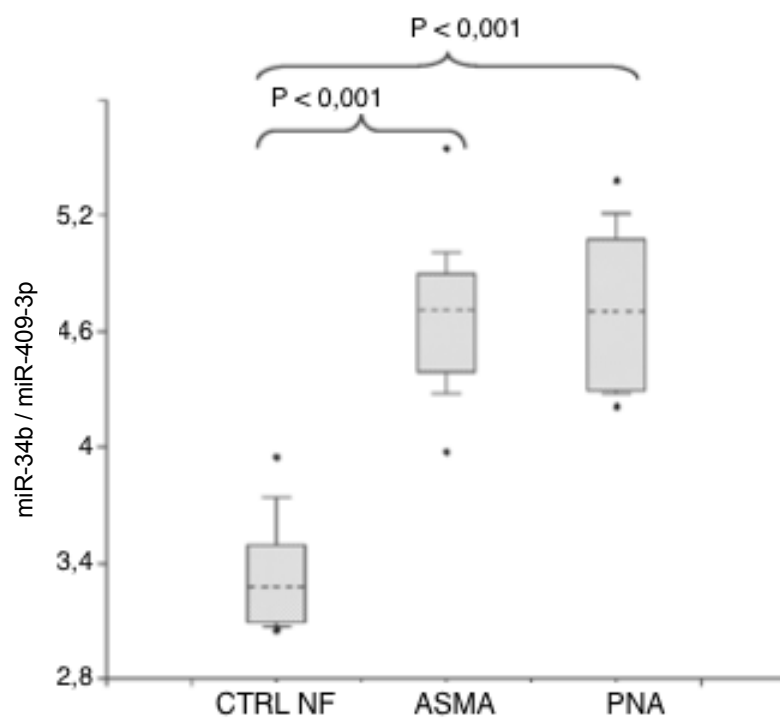


Figura 10A

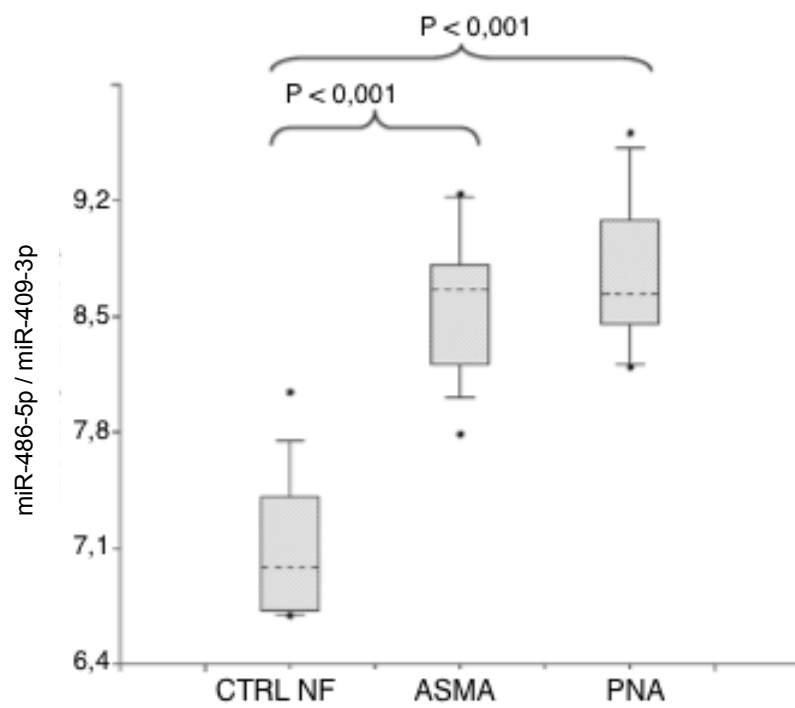


Figura 10B

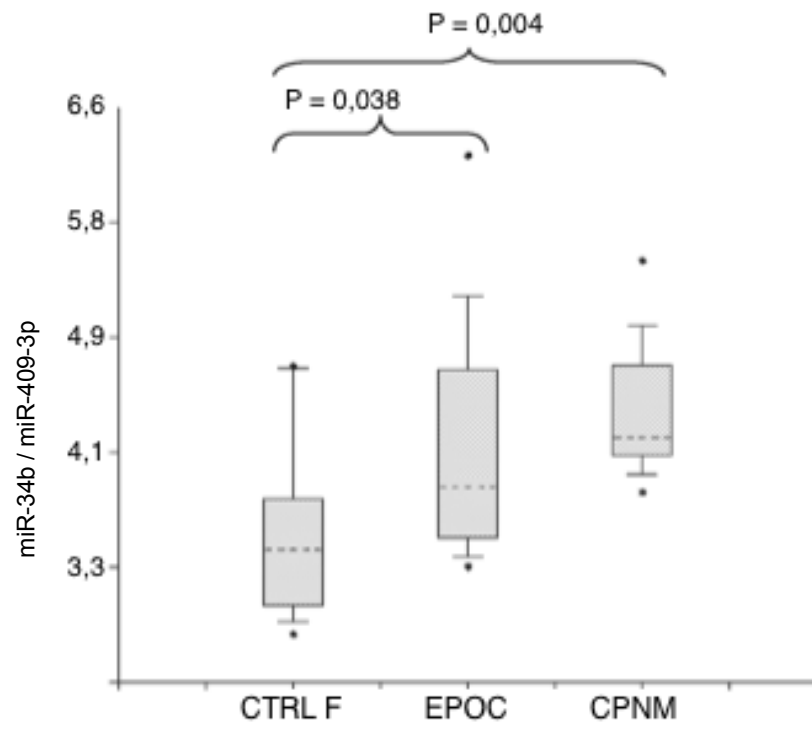


Figura 10C

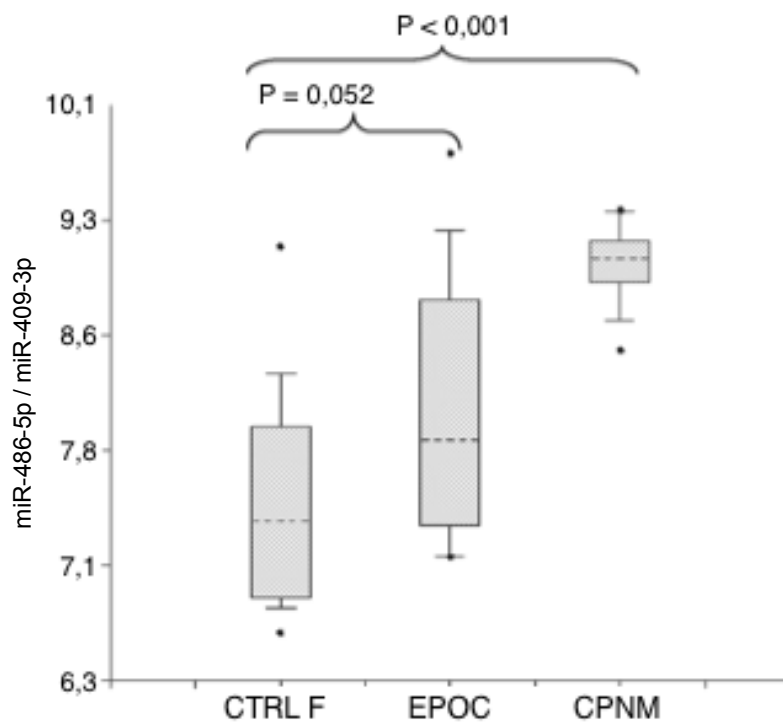
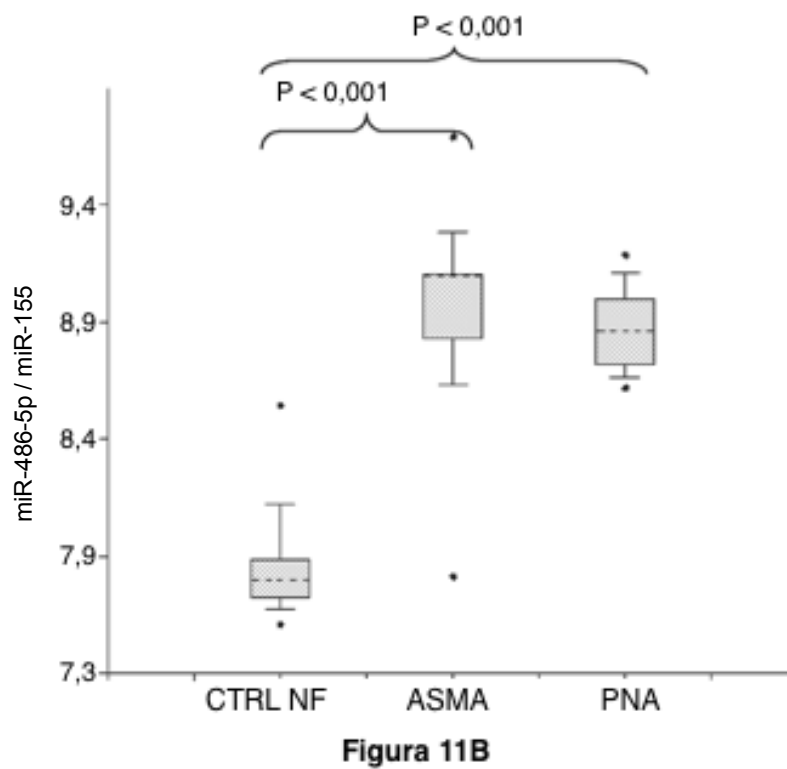
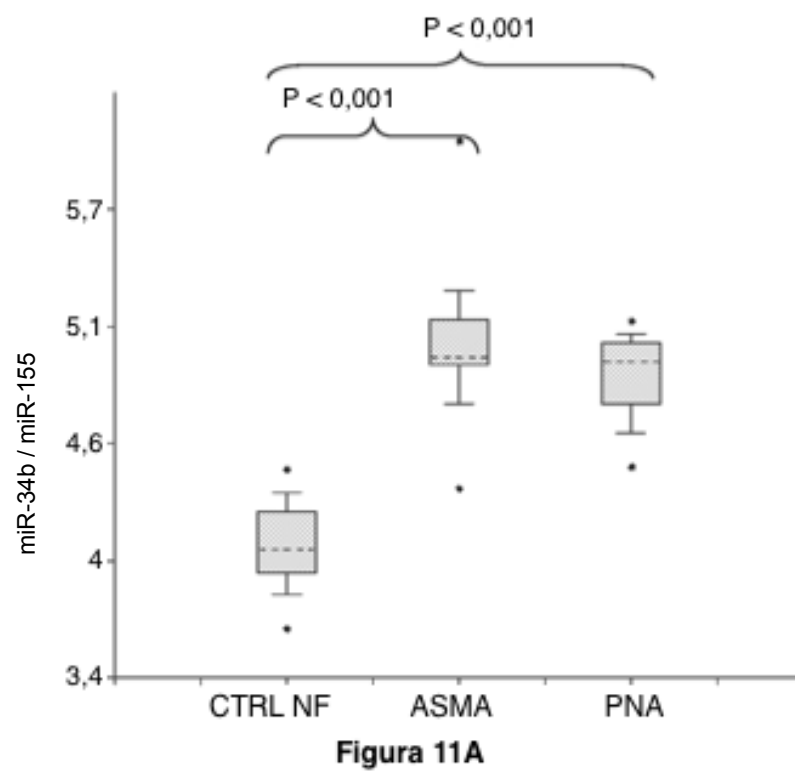


Figura 10D



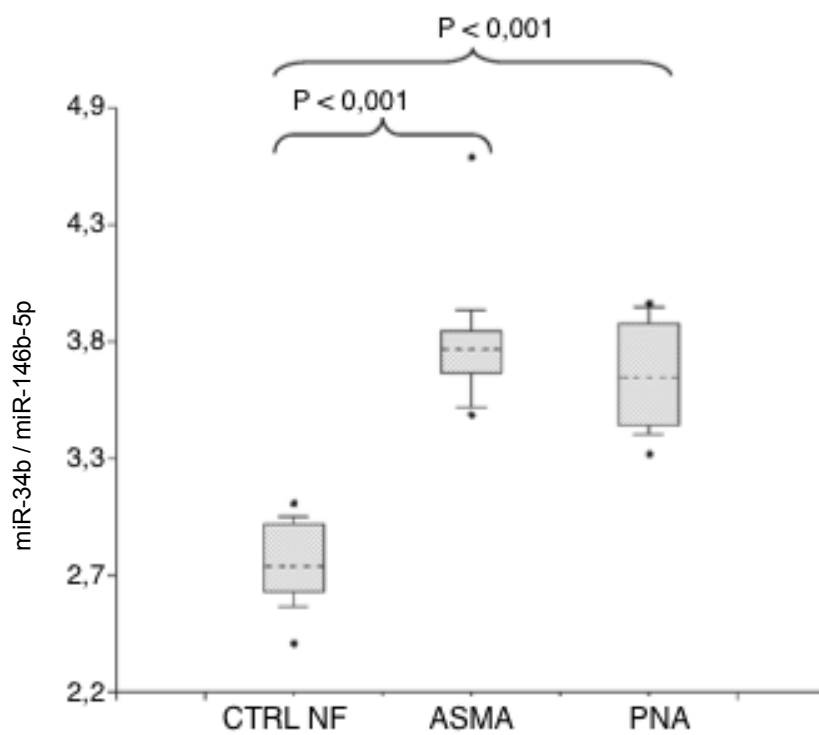


Figura 11C

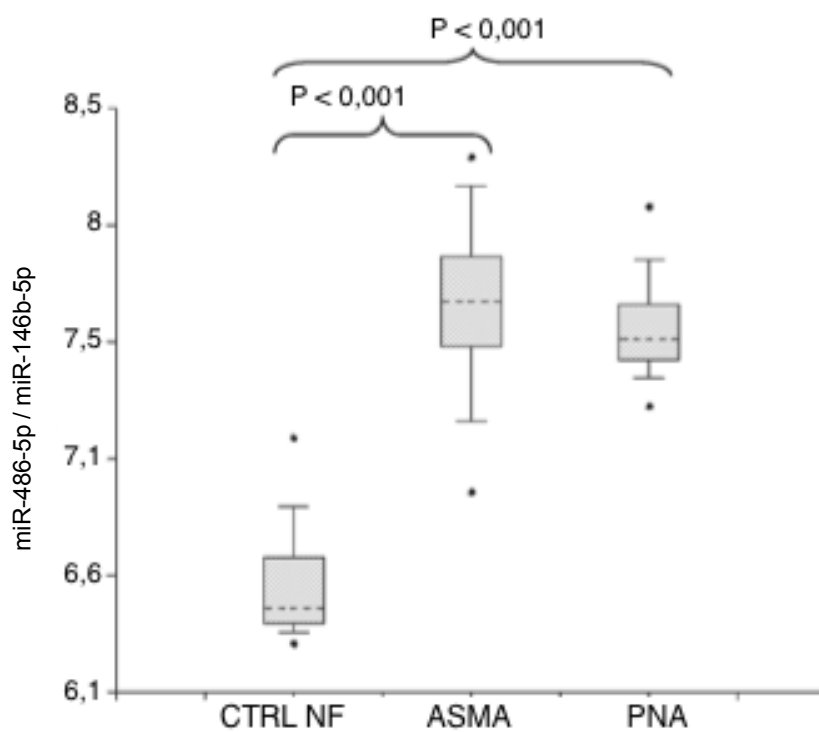


Figura 11D

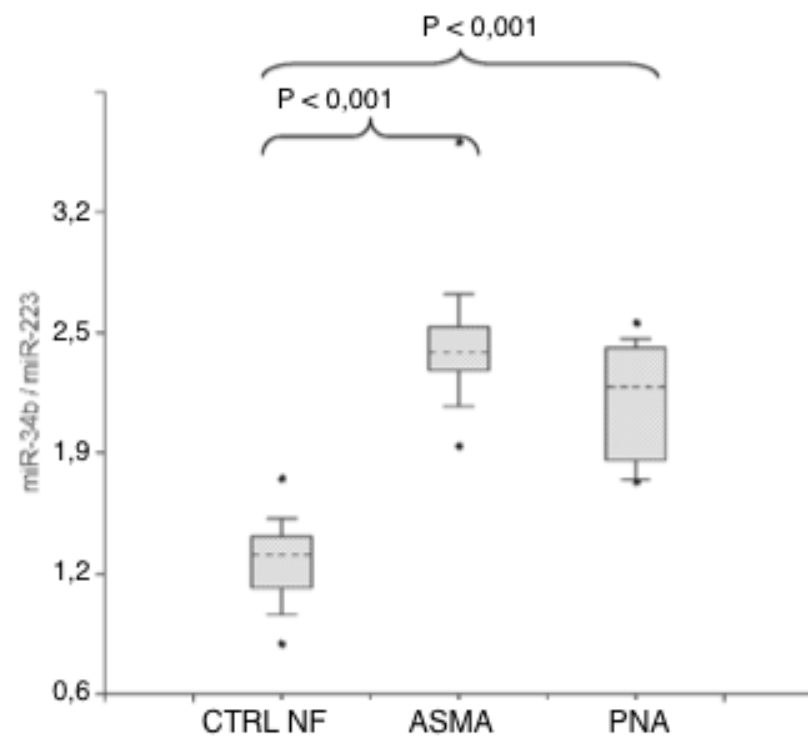


Figura 11E

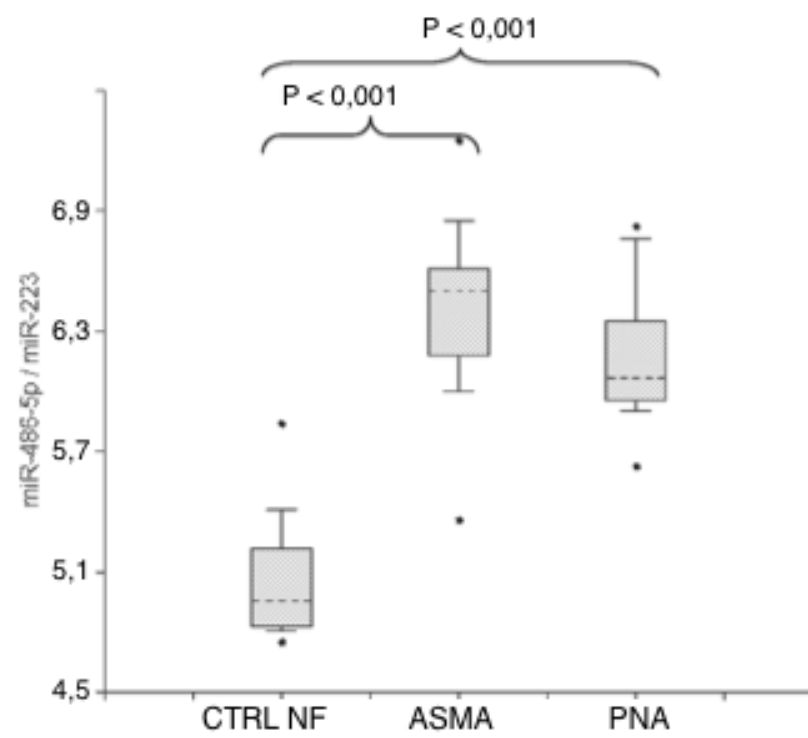


Figura 11F

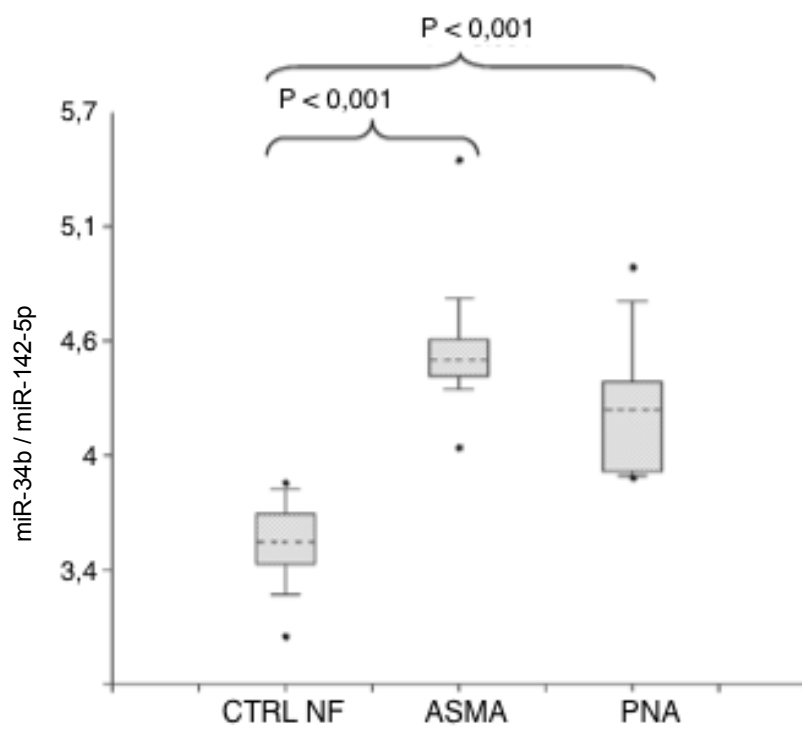


Figura 11G

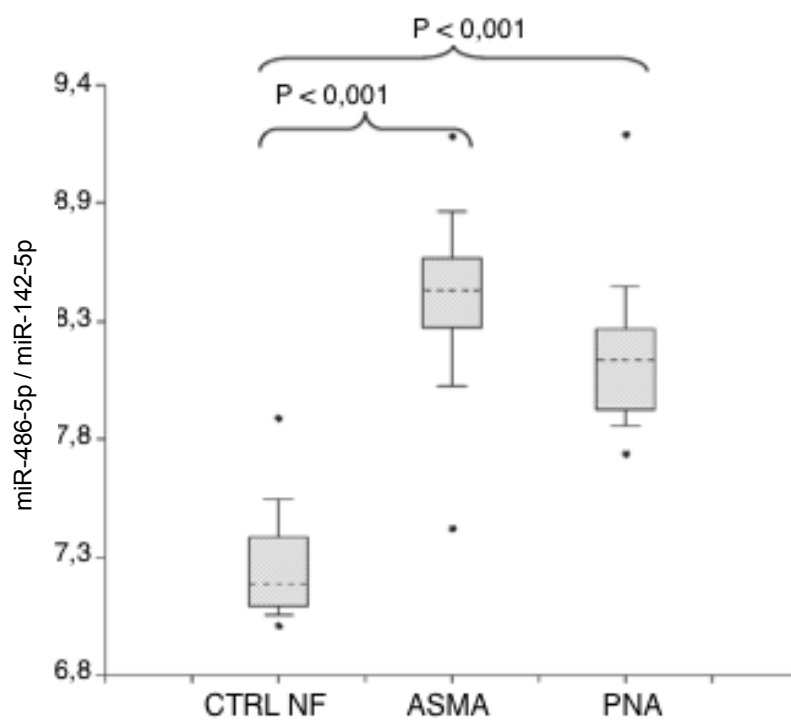


Figura 11H

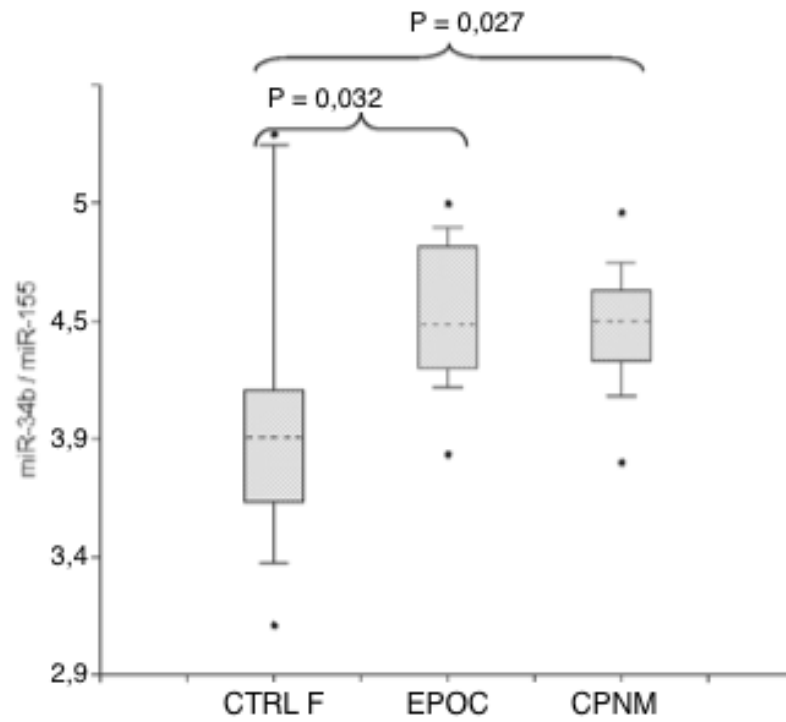


Figura 12A

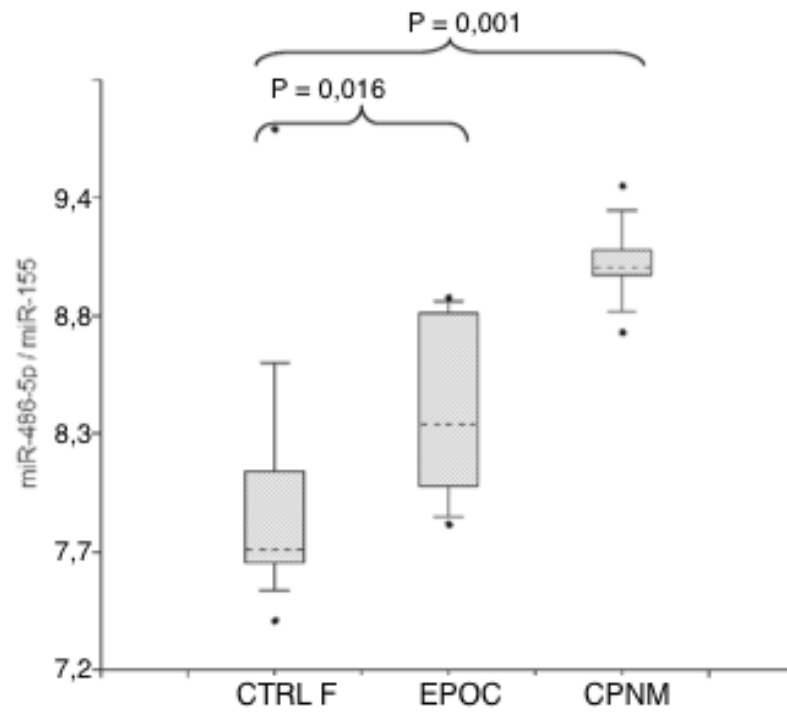


Figura 12B

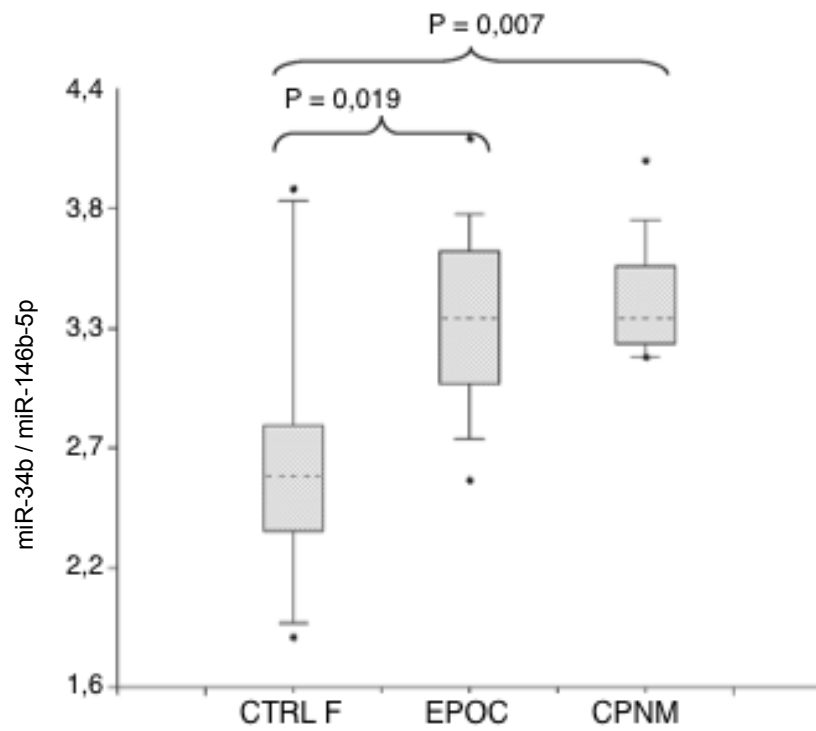


Figura 12C

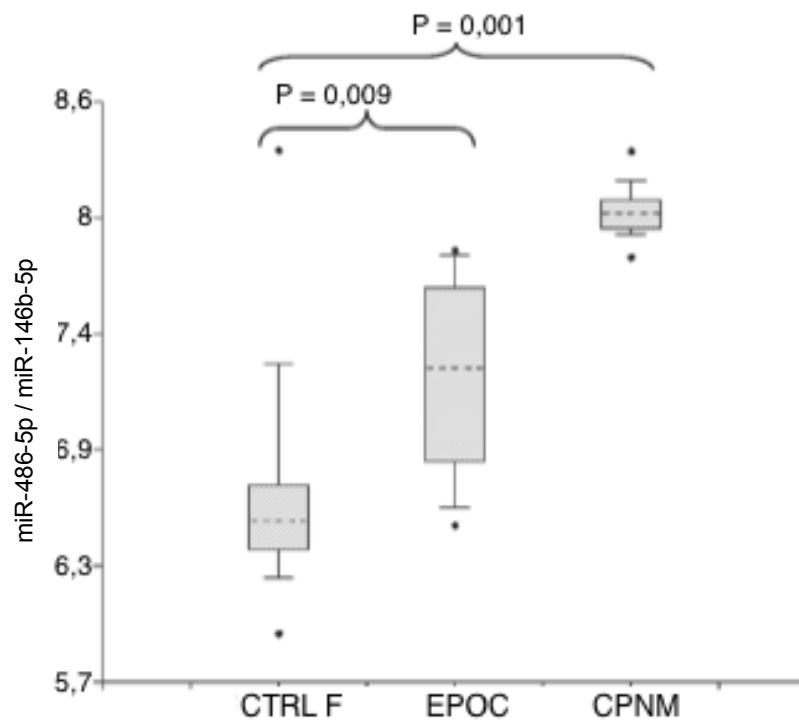


Figura 12D

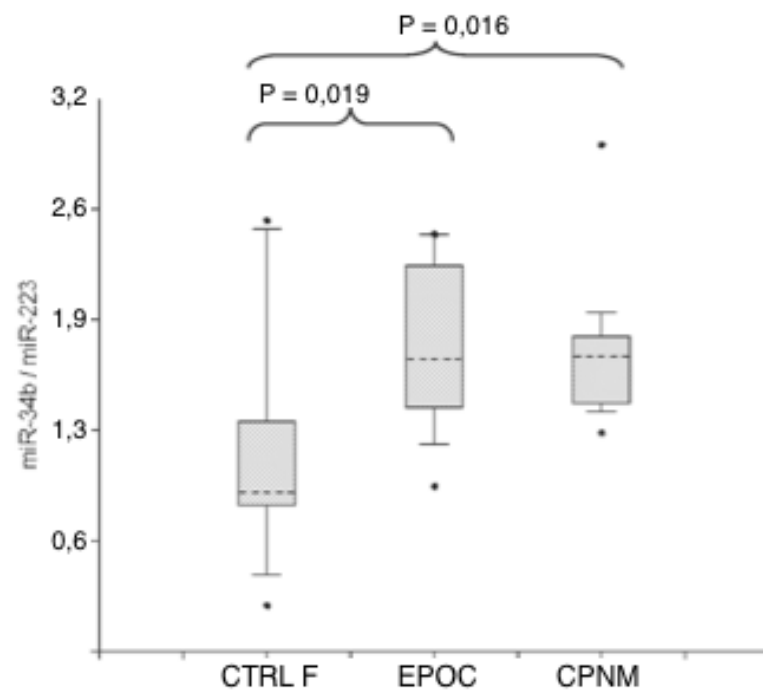


Figura 12E

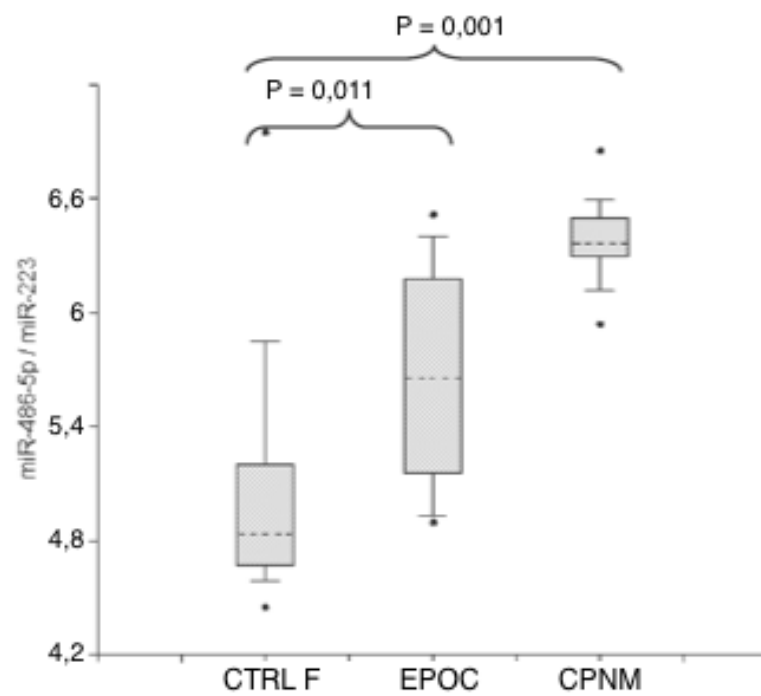


Figura 12F

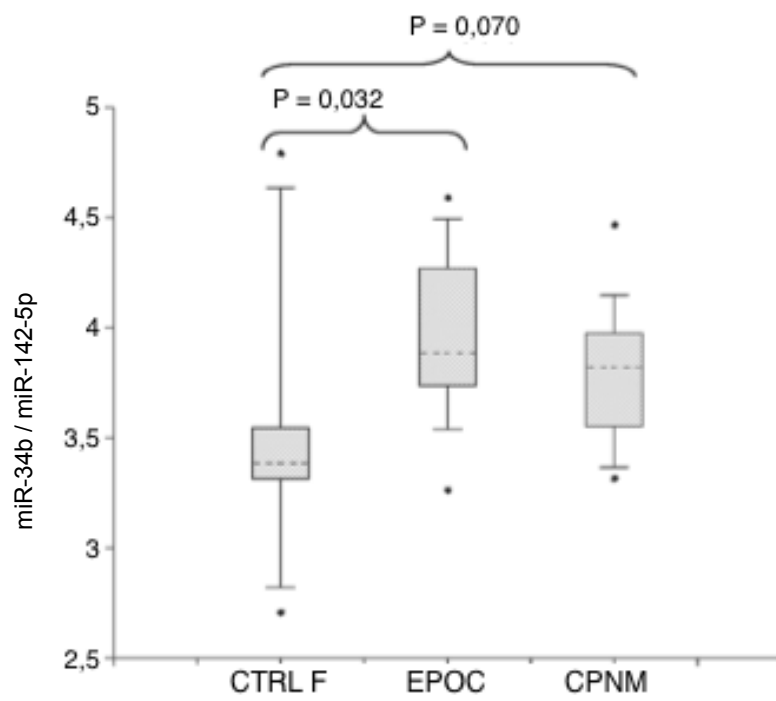


Figura 12G

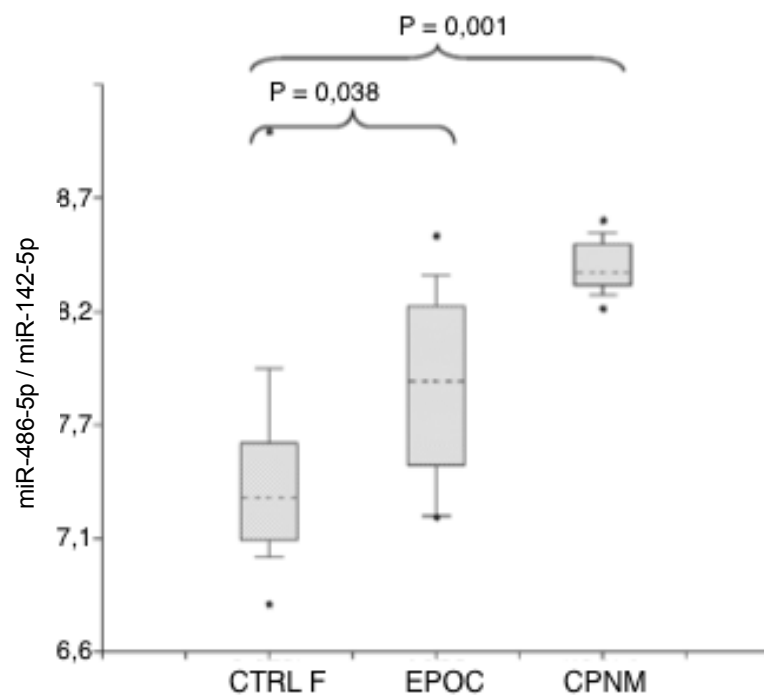


Figura 12H

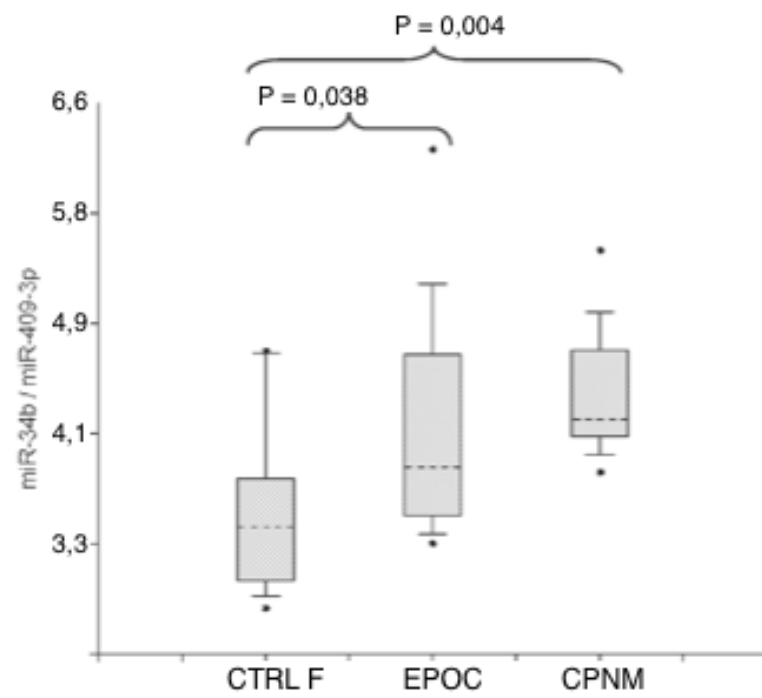


Figura 12I

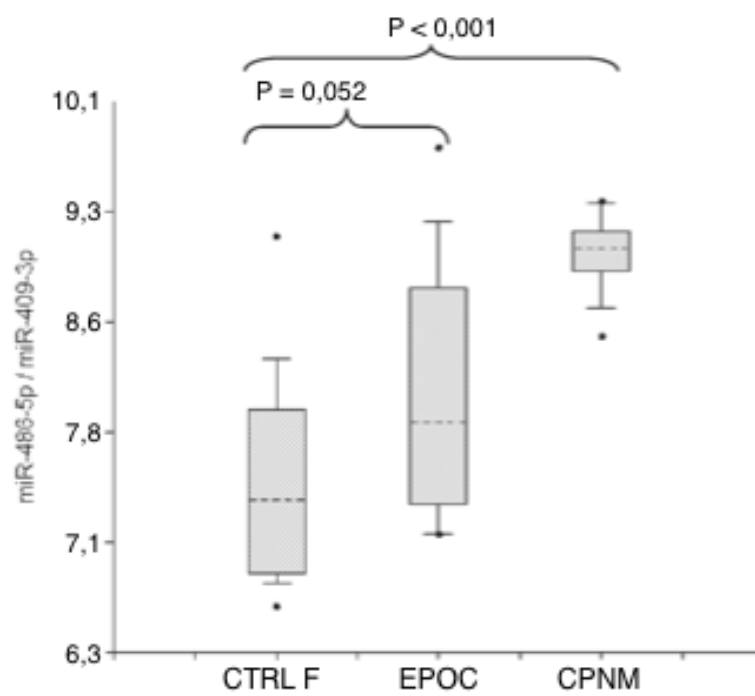


Figura 12J

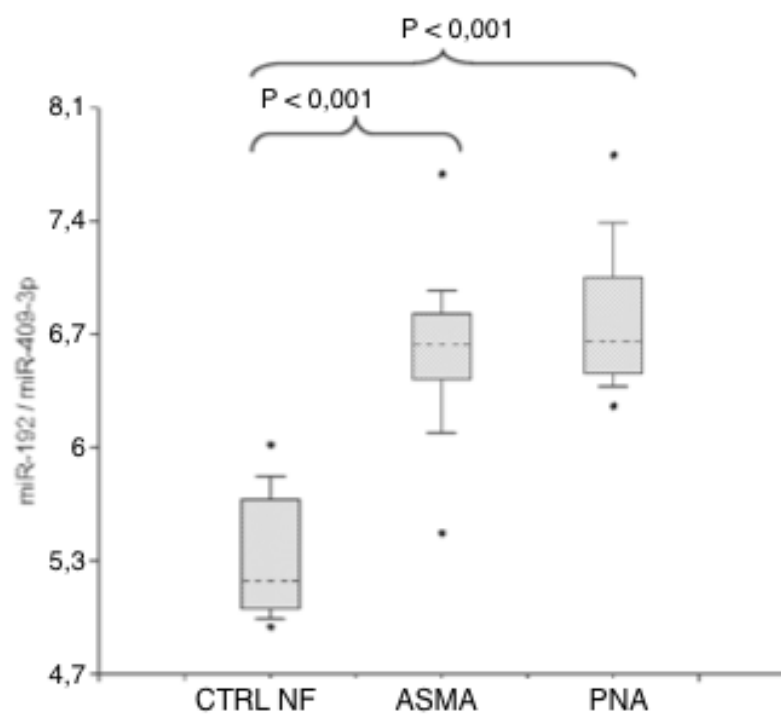


Figura 13A

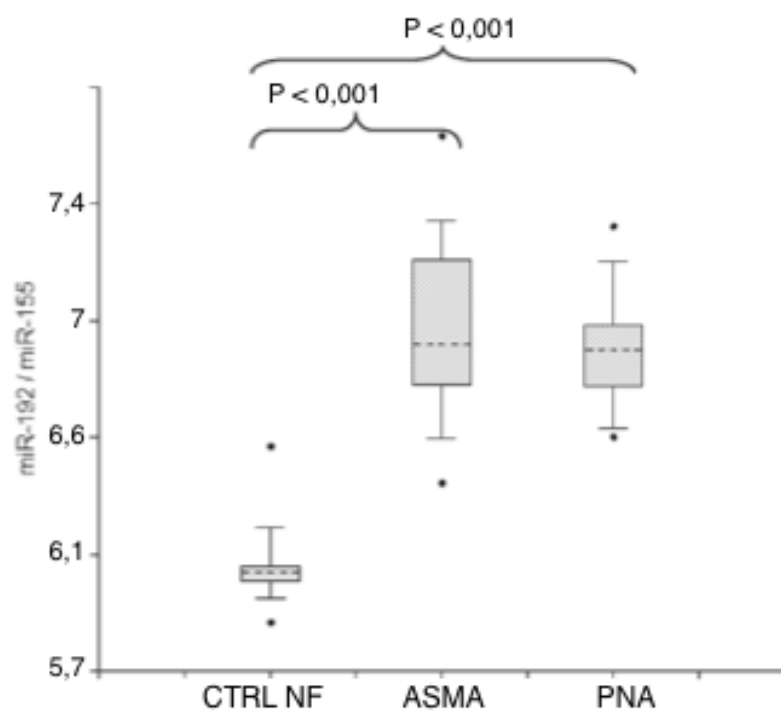


Figura 13B

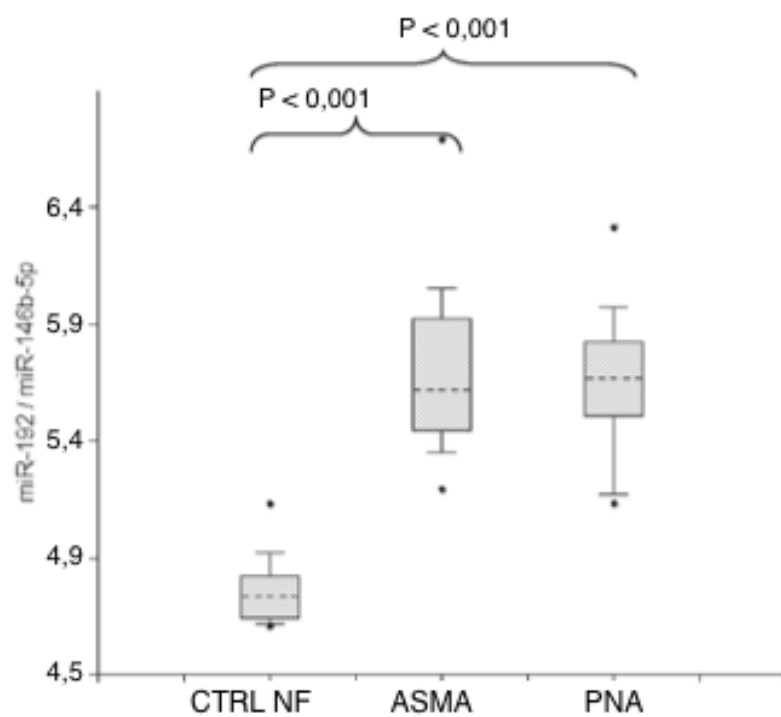


Figura 13C

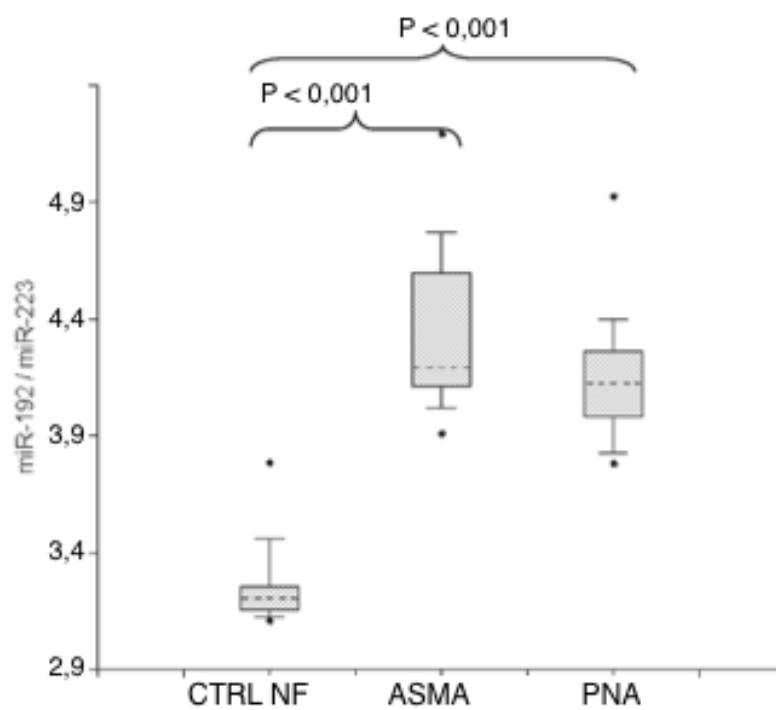


Figura 13D

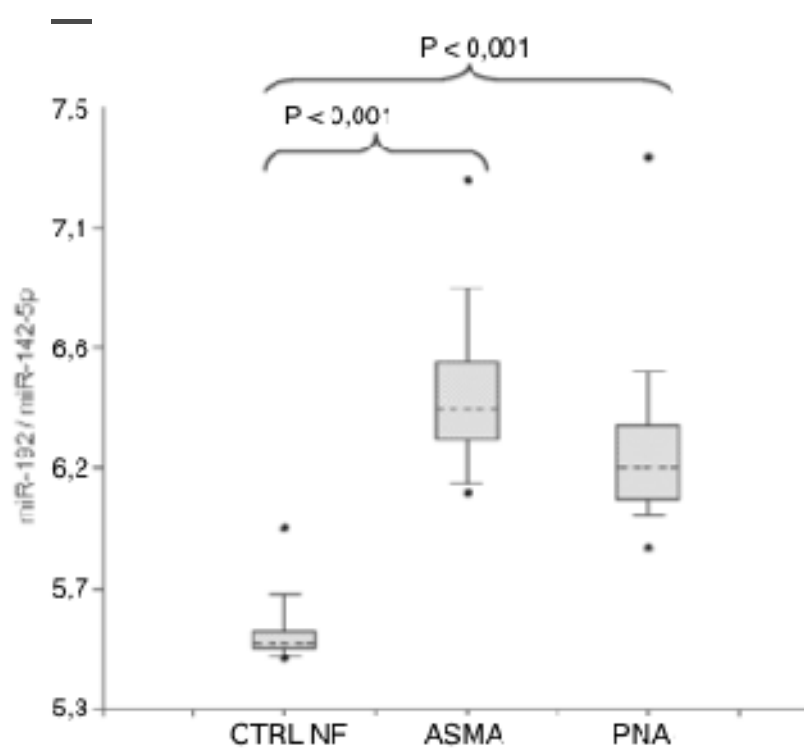


Figura 13E

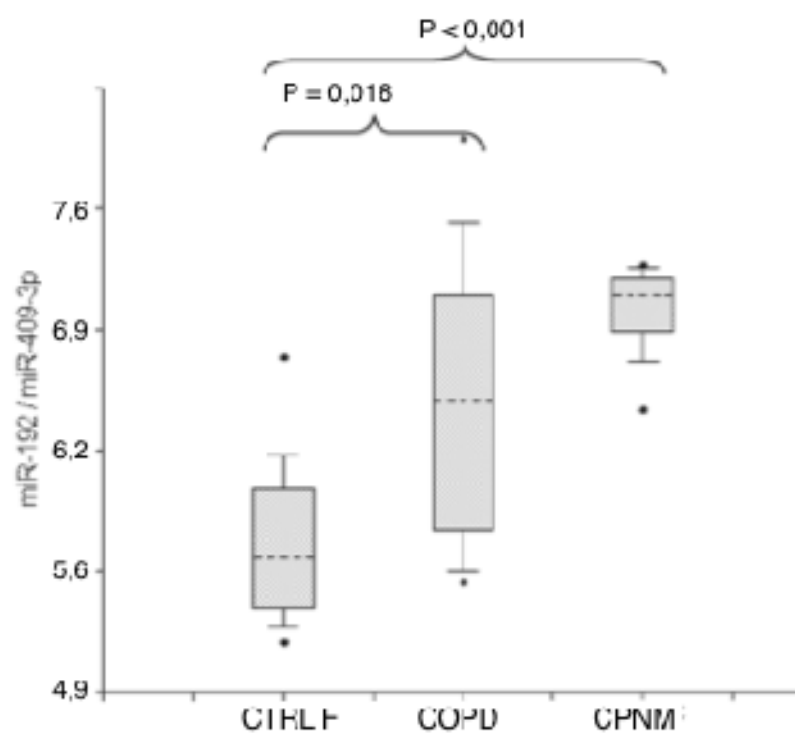


Figura 13F

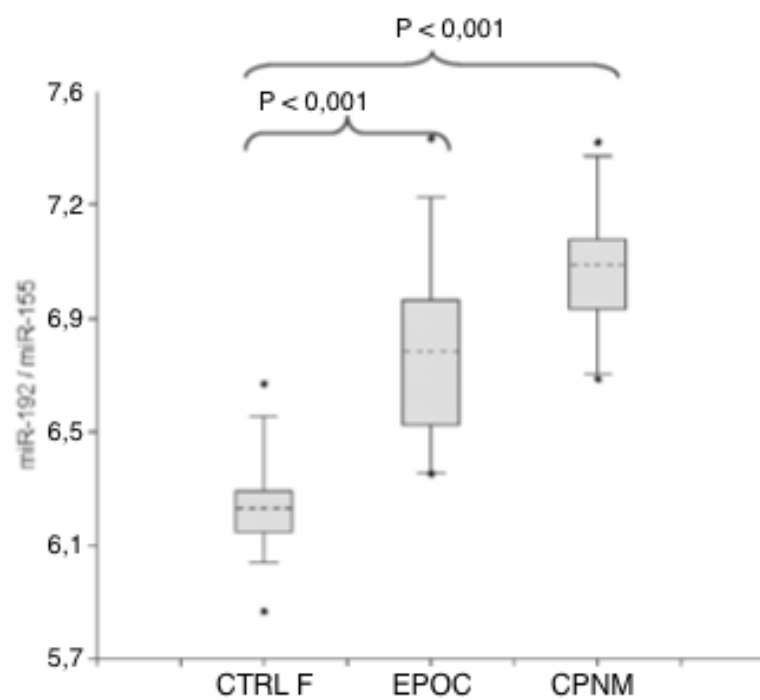


Figura 13G

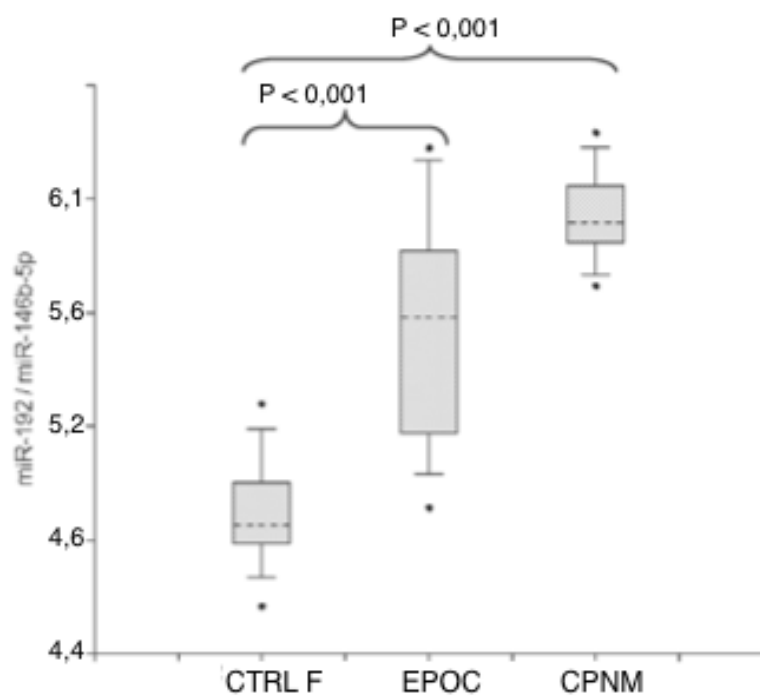


Figura 13H

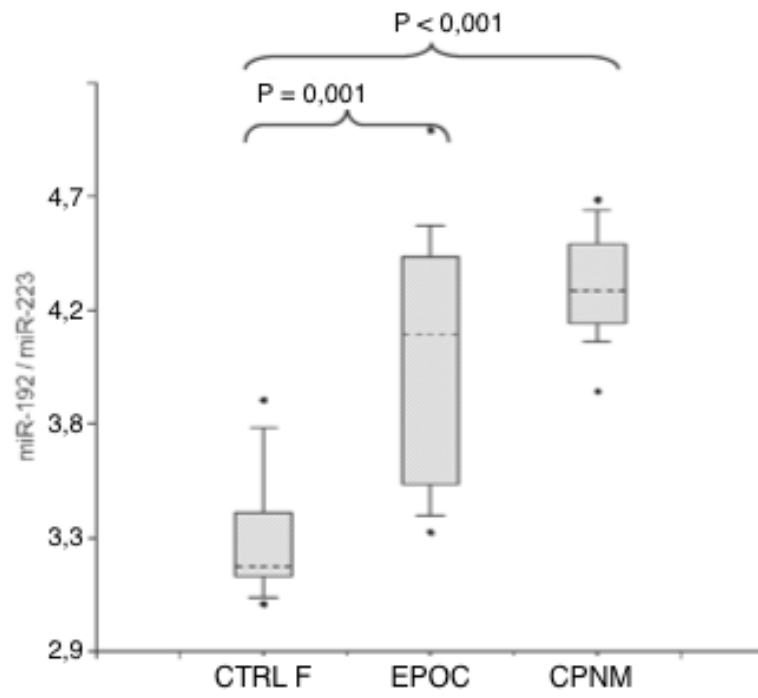


Figura 13I

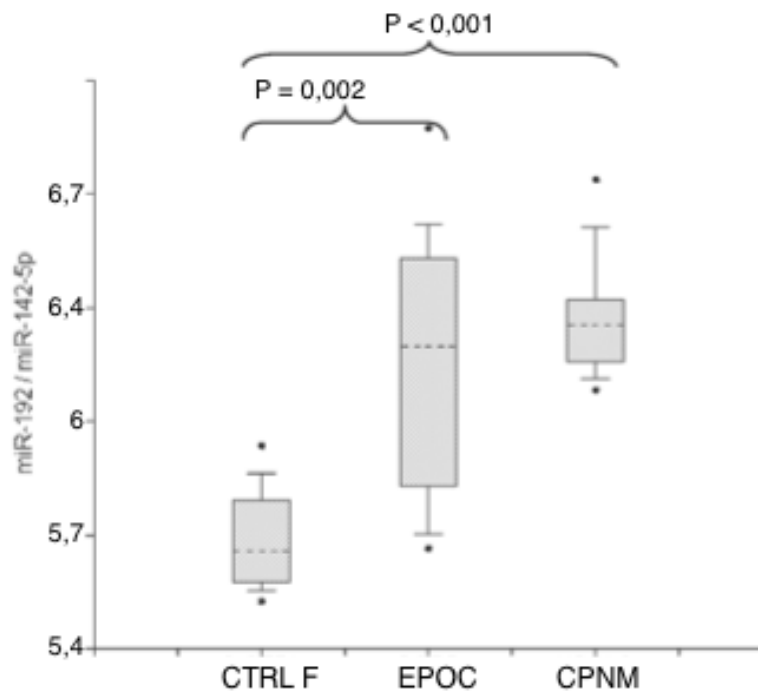


Figura 13J

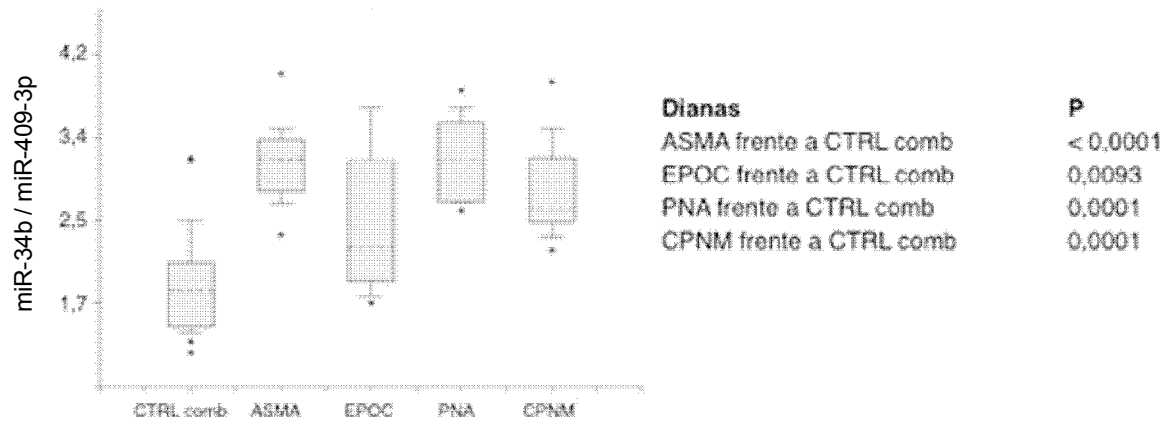


Figura 14A

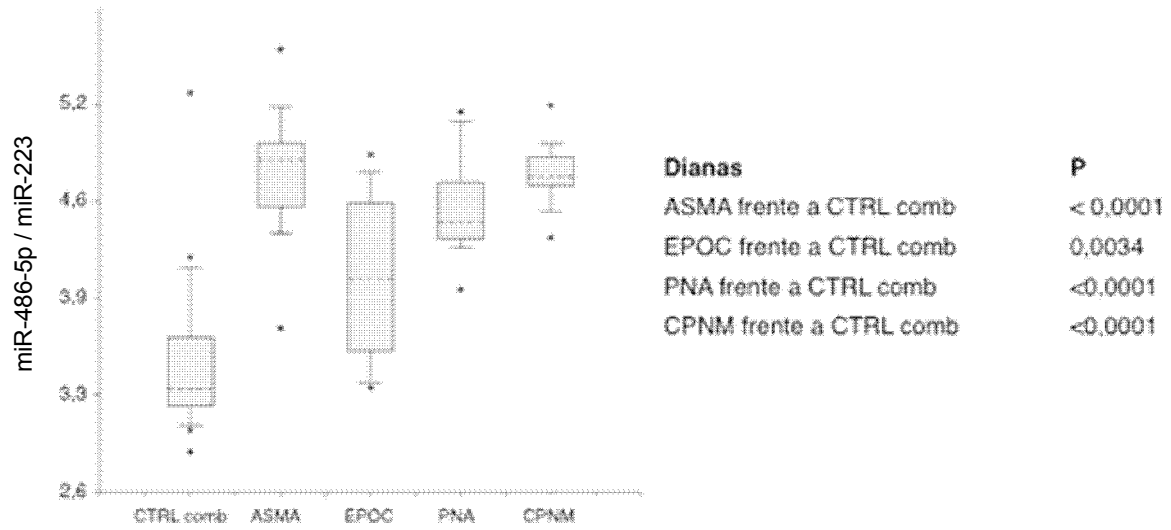


Figura 14B

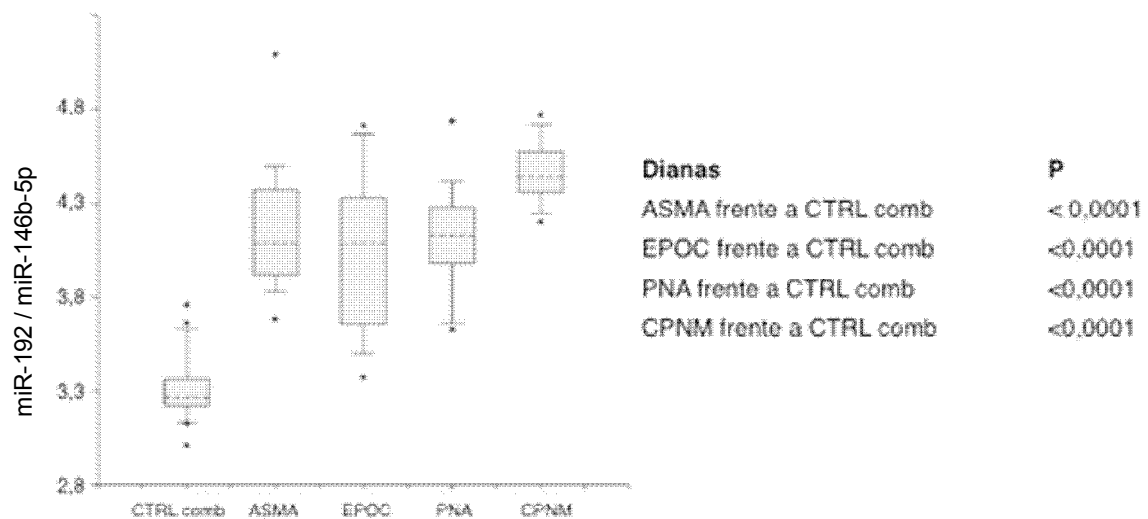


Figura 14C

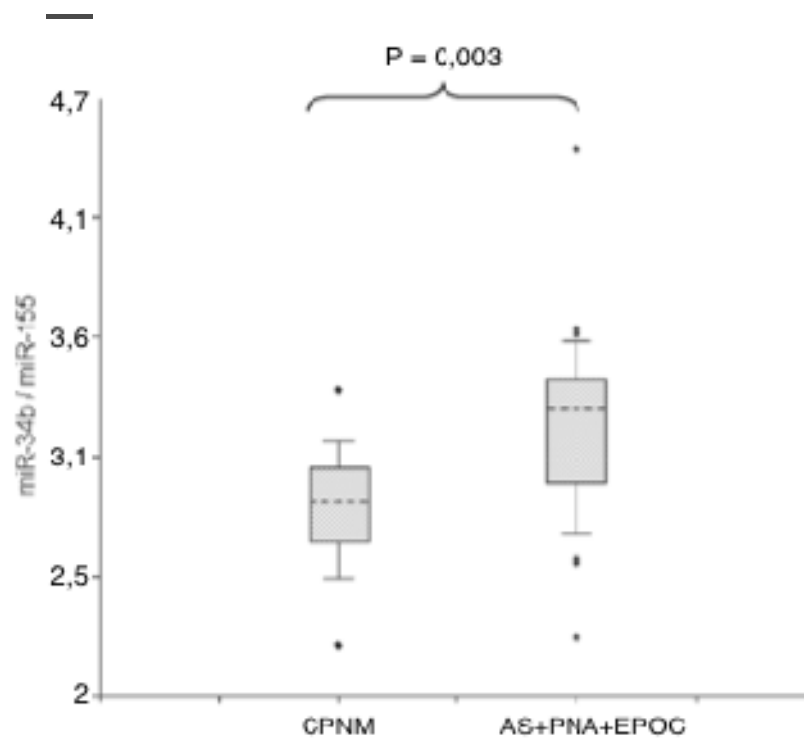


Figura 15A

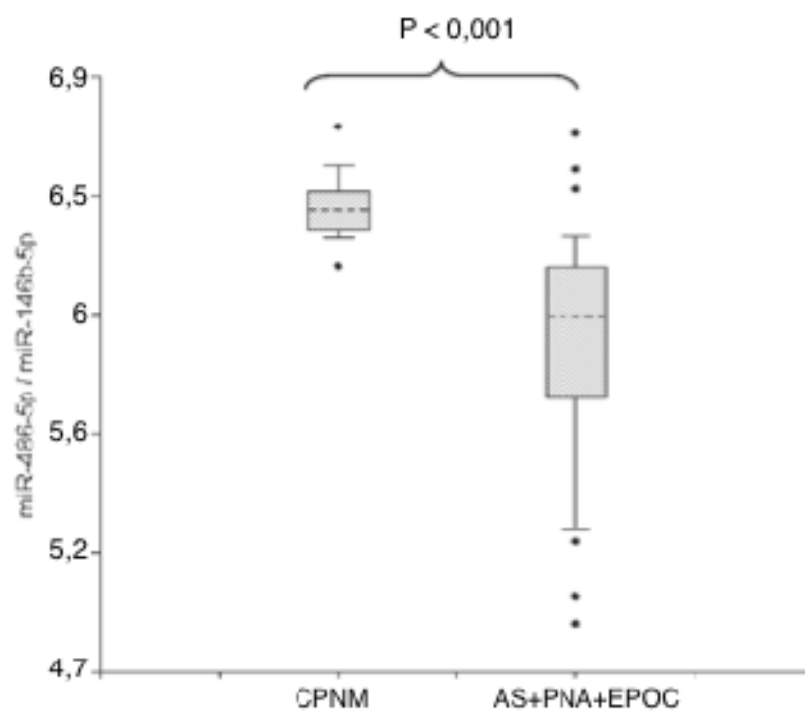


Figura 15B

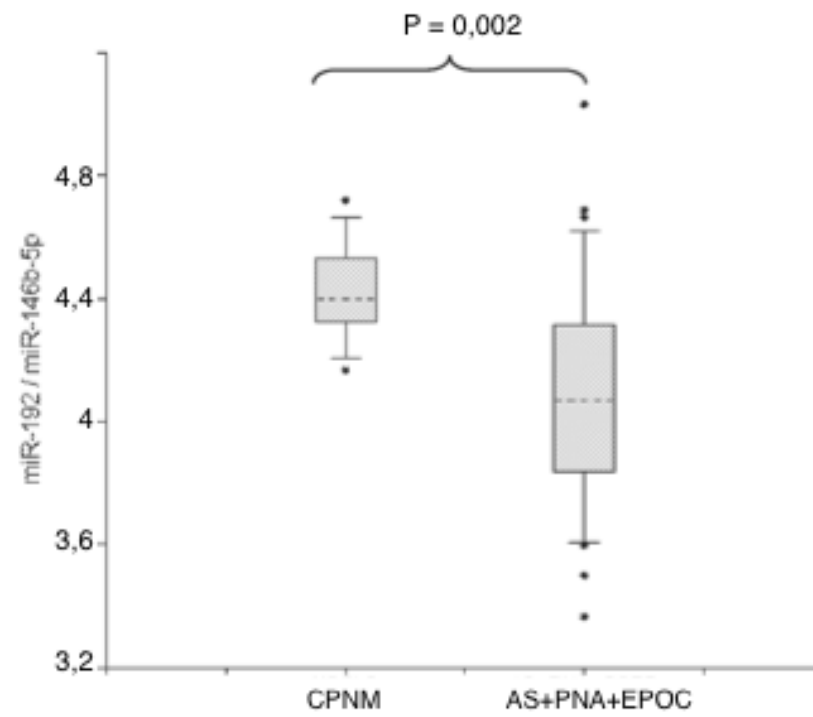
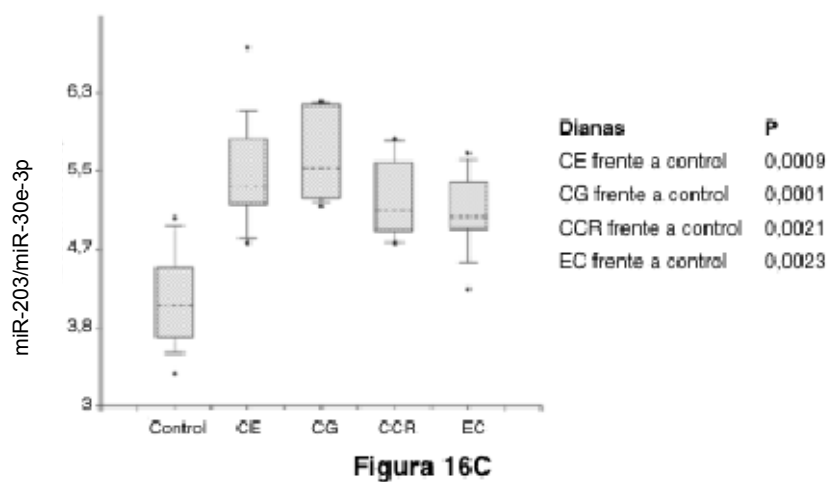
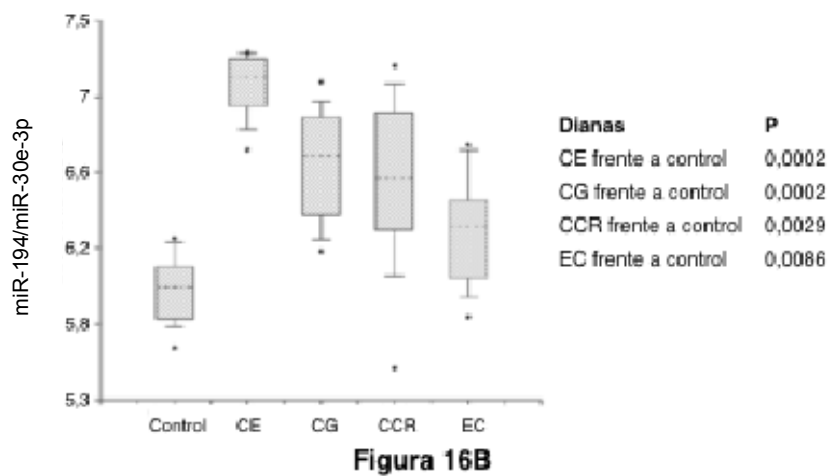
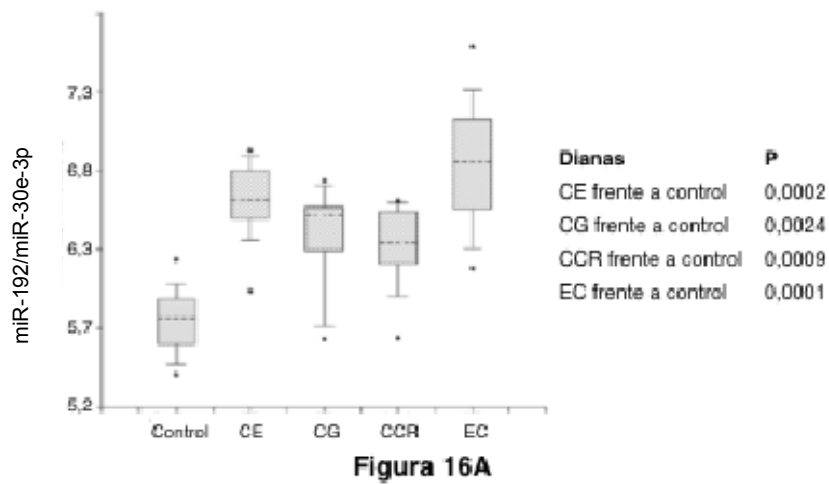
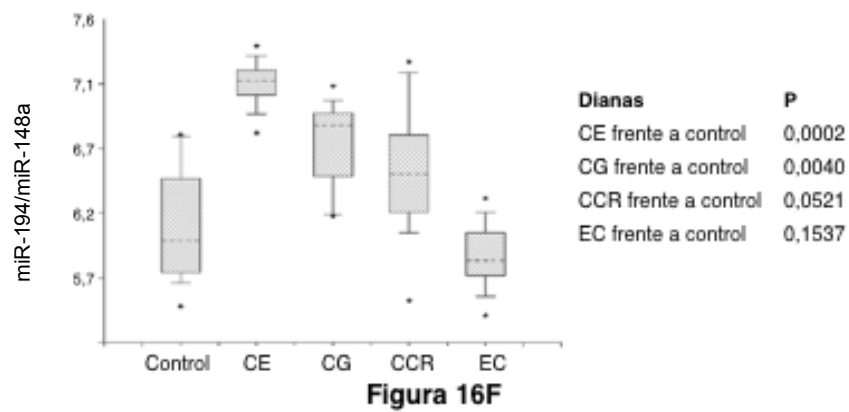
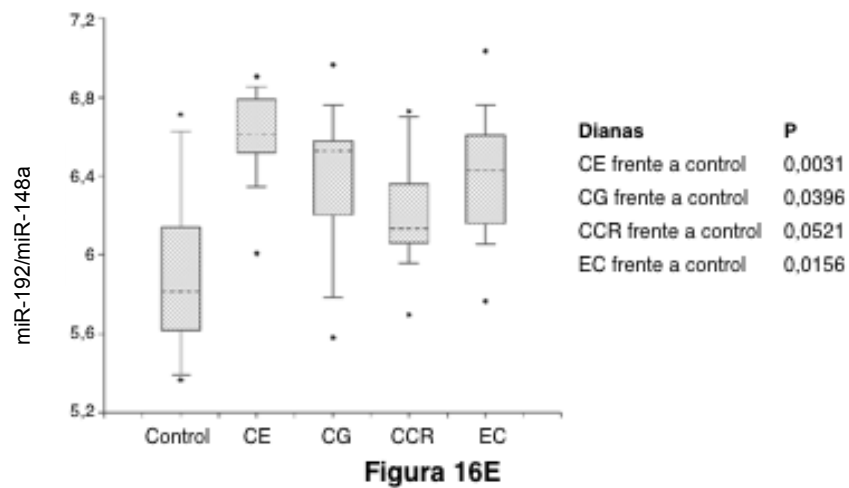
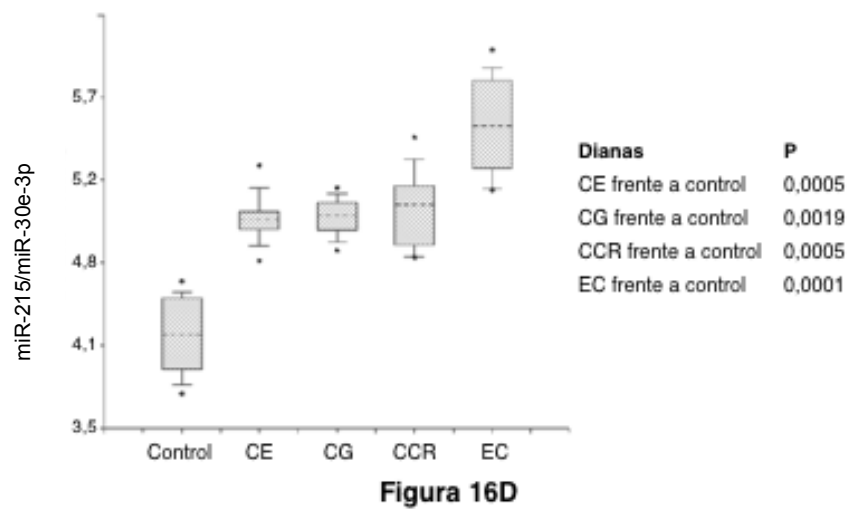
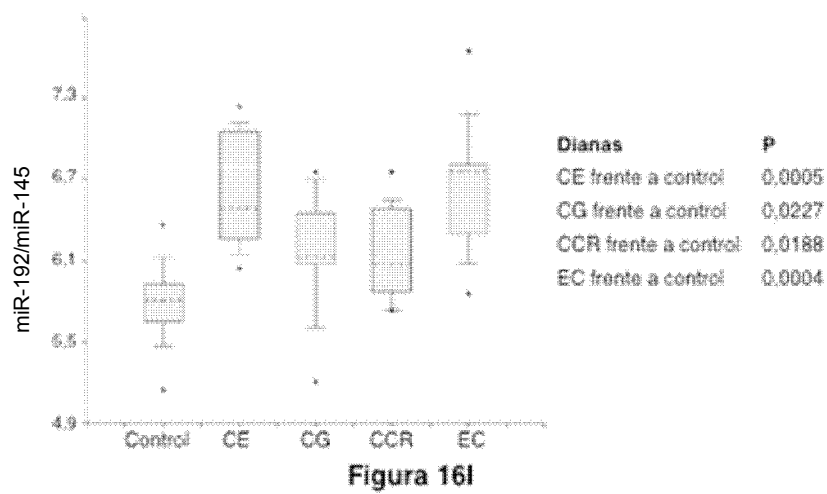
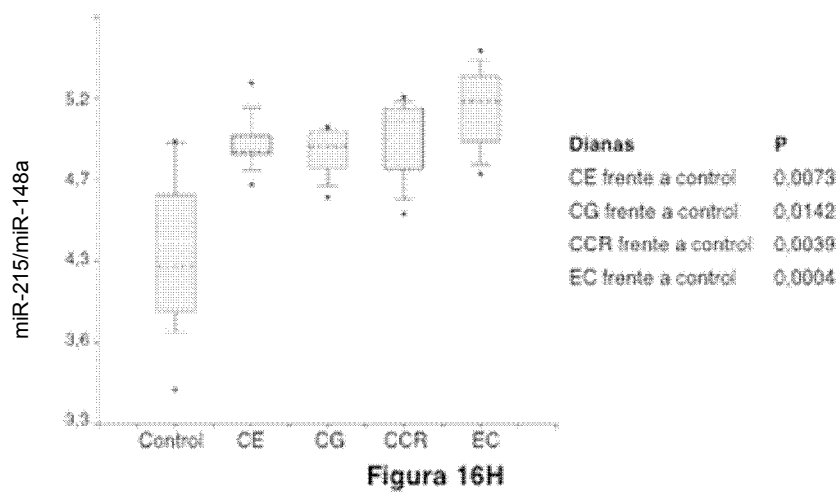
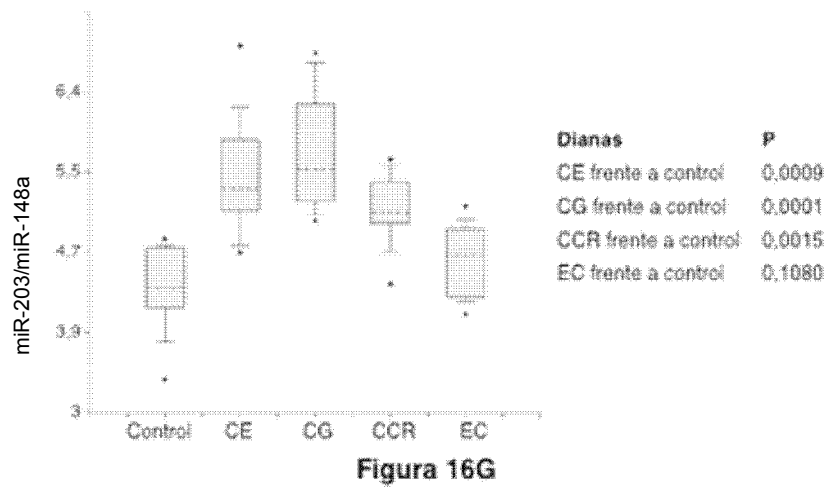
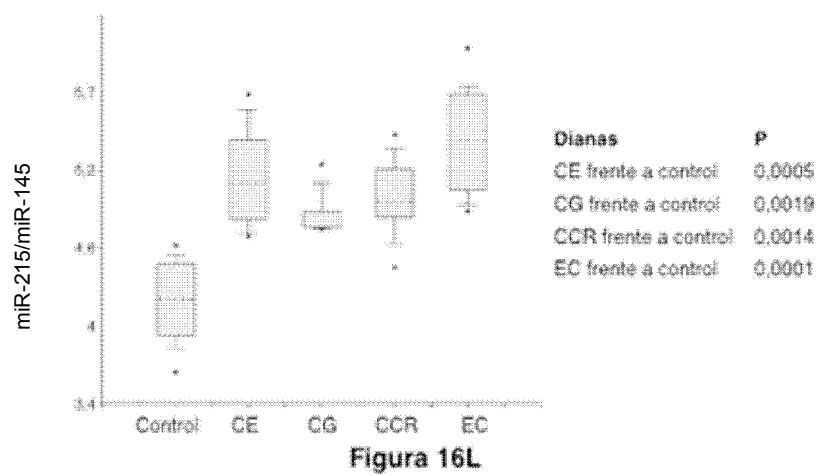
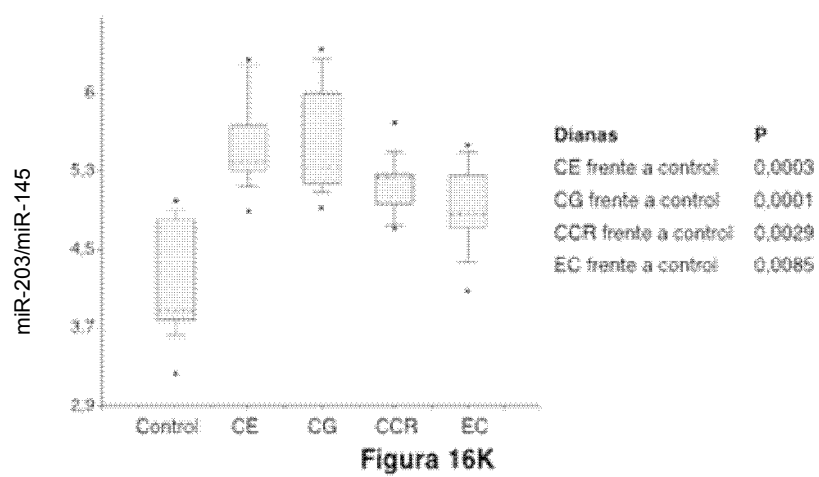
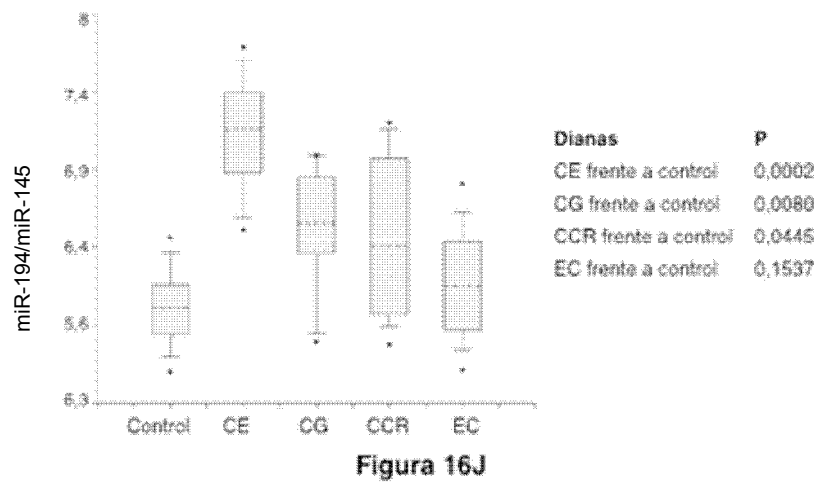


Figura 15C









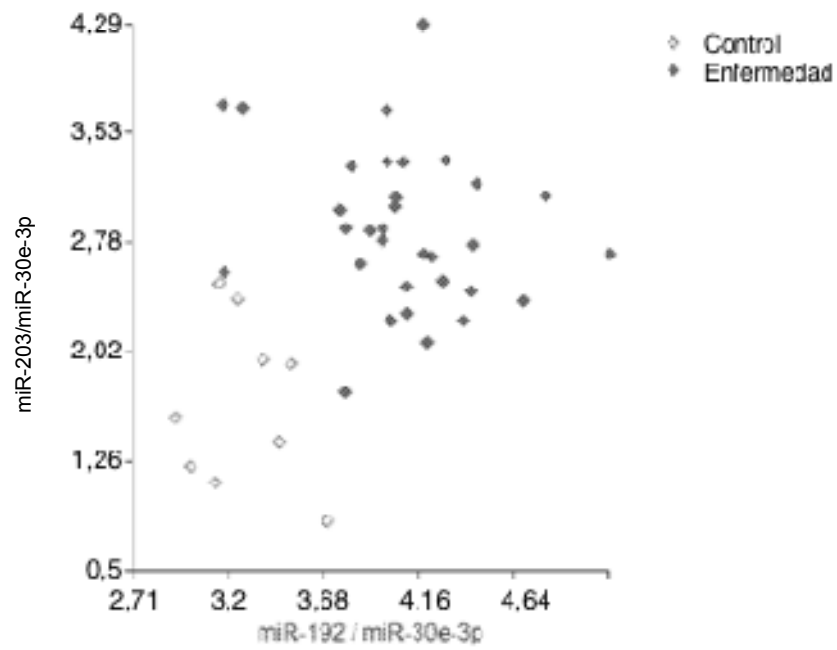


Figura 16M

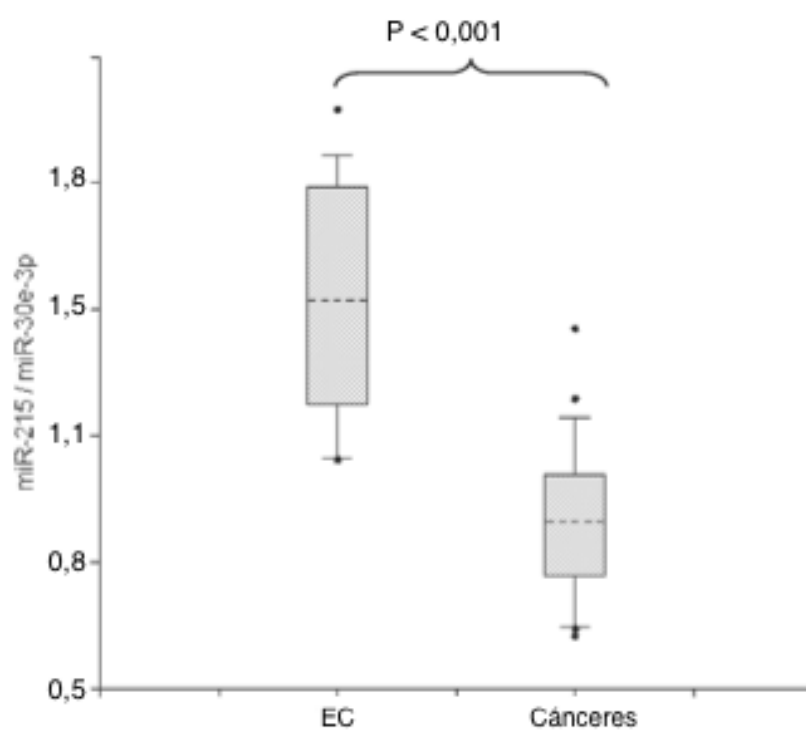


Figura 17A

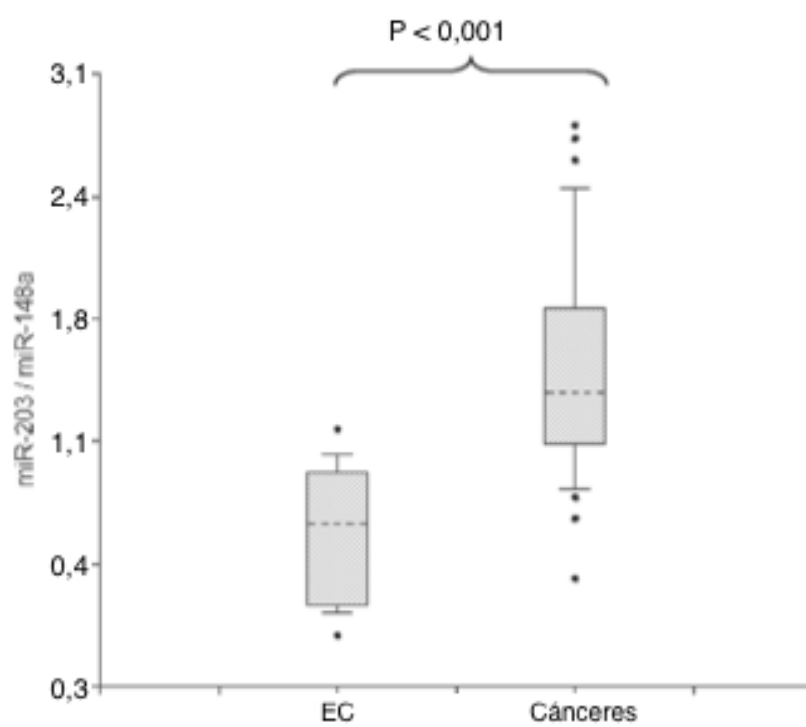


Figura 17B

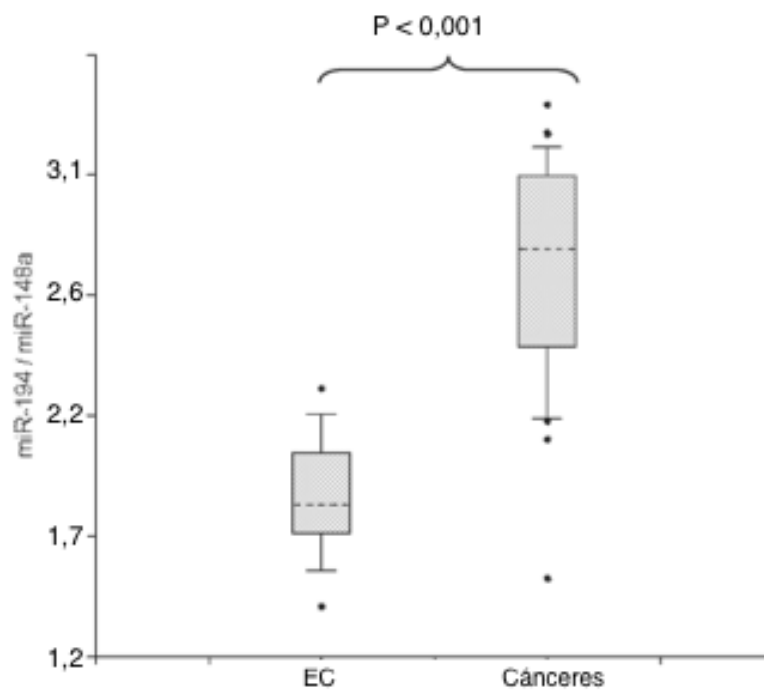


Figura 17C

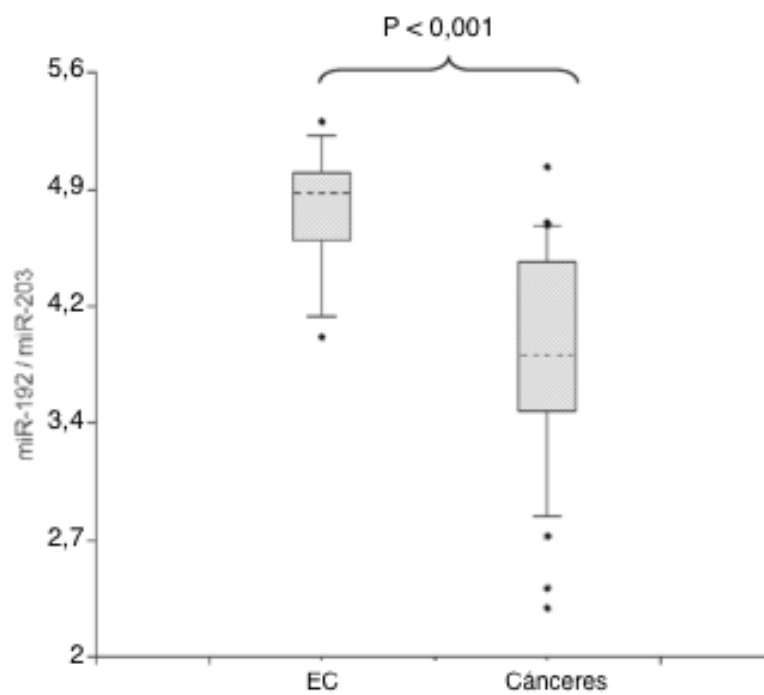


Figura 17D

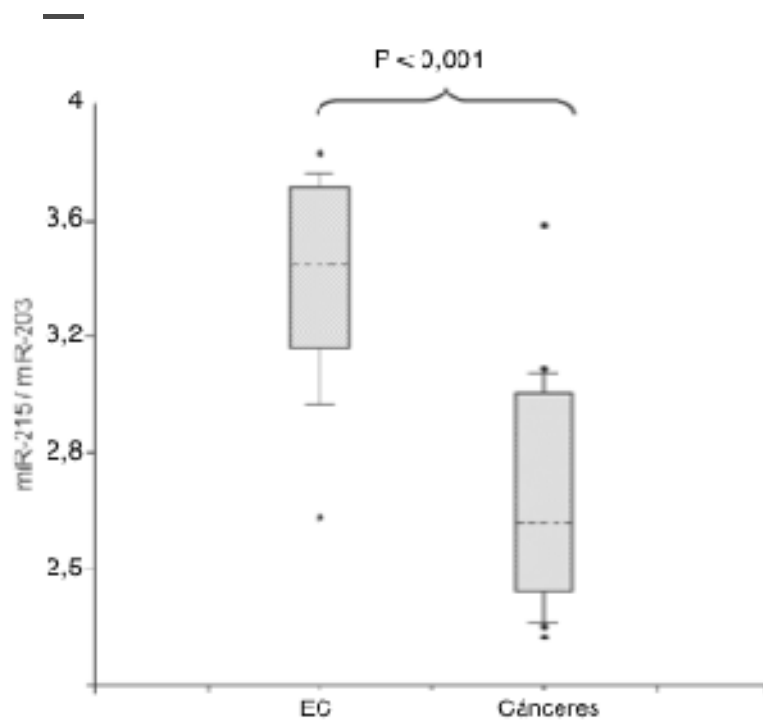


Figura 17E

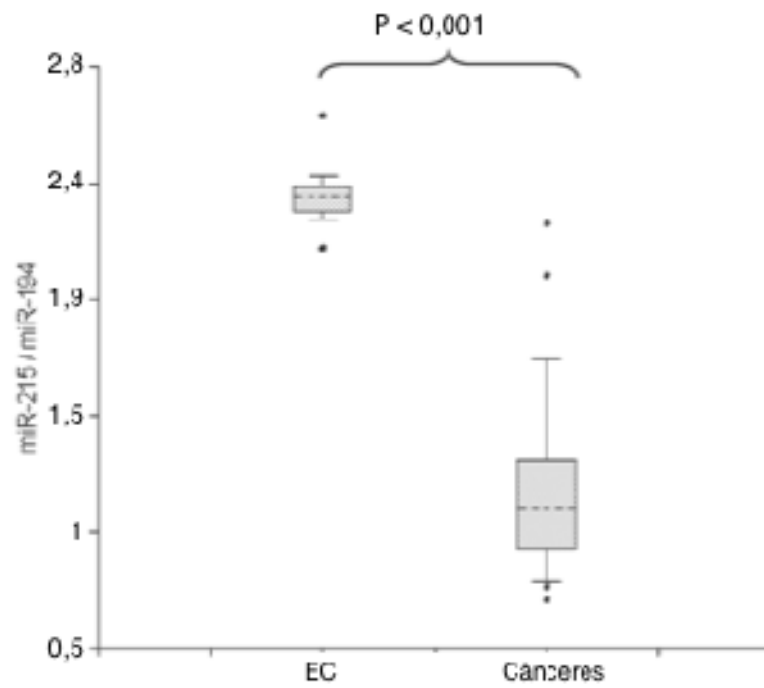


Figura 17F

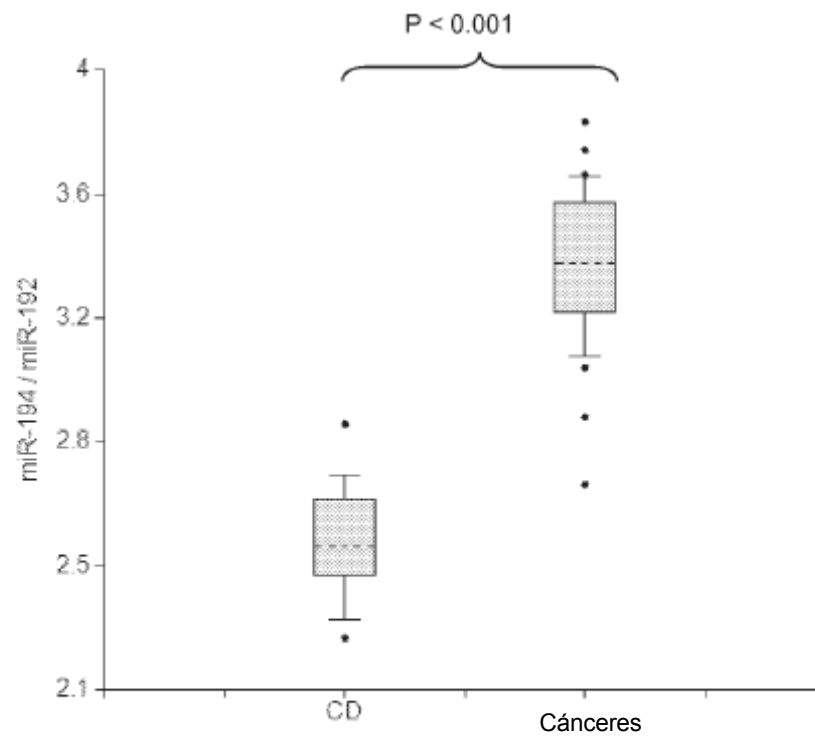


Figura 17G

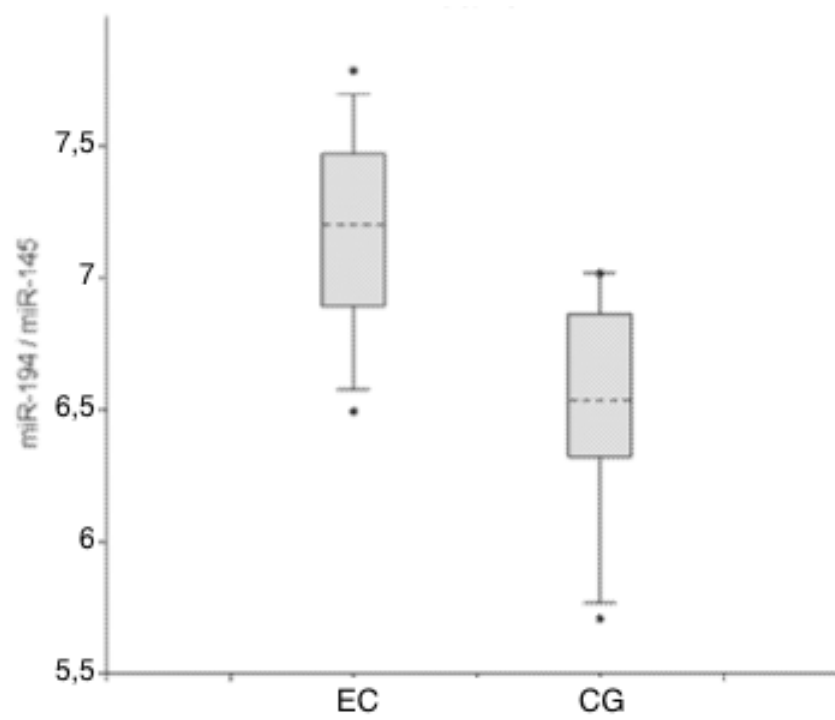


Figura 18A

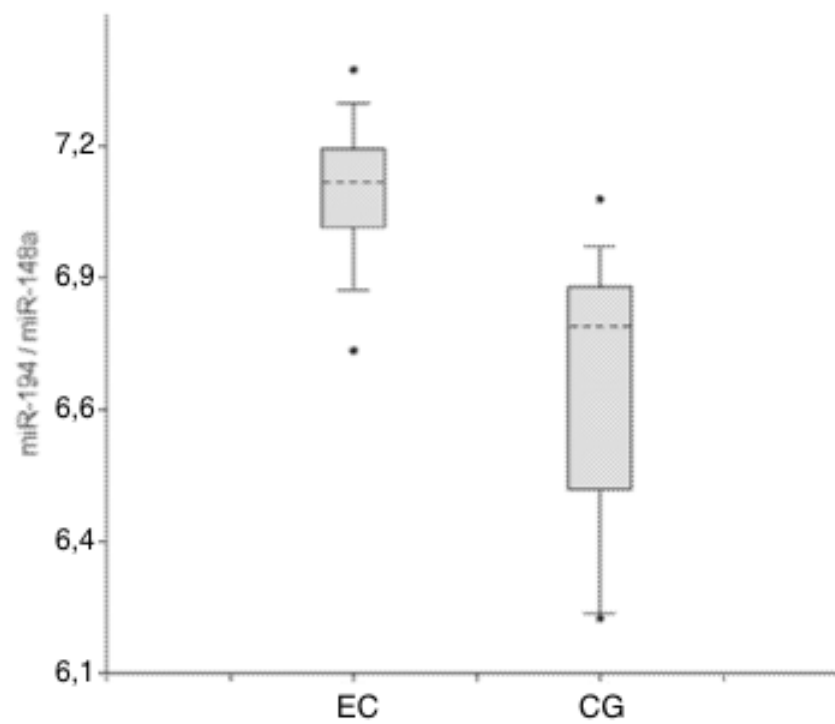


Figura 18B

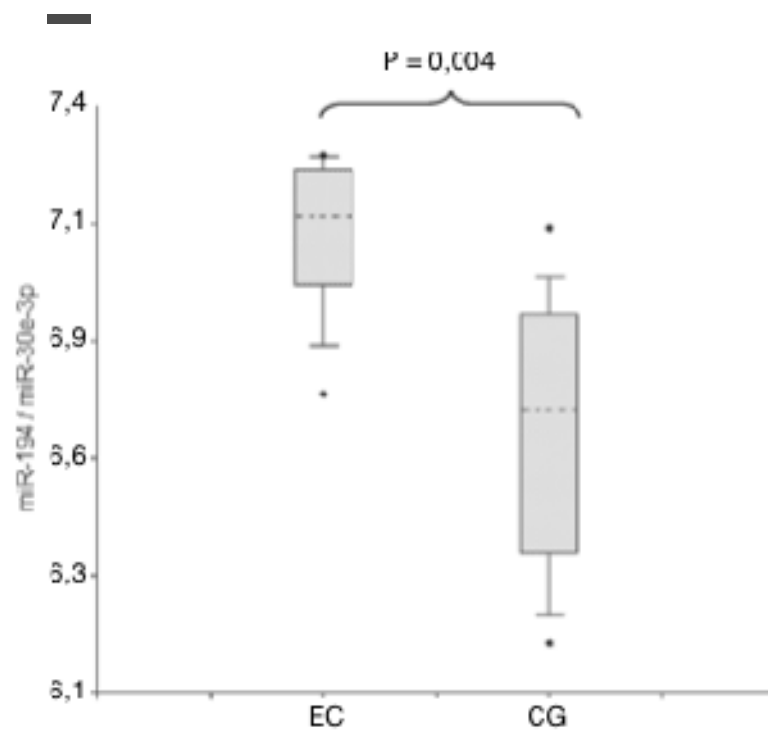


Figura 18C

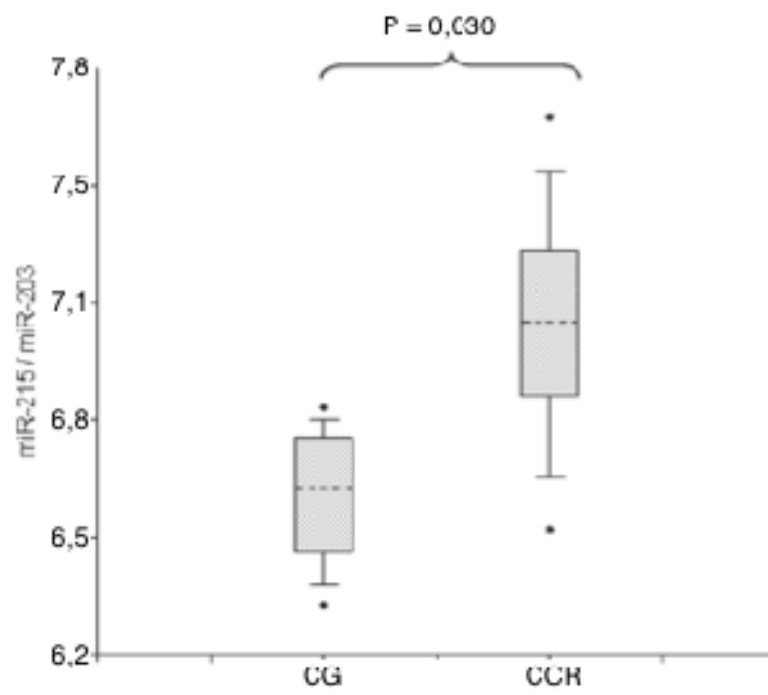


Figura 18D

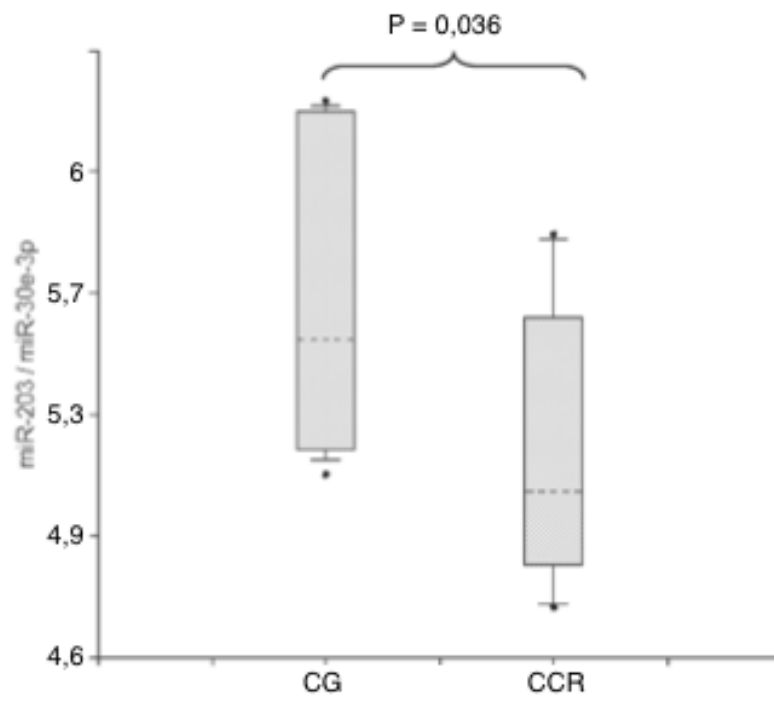


Figura 18E

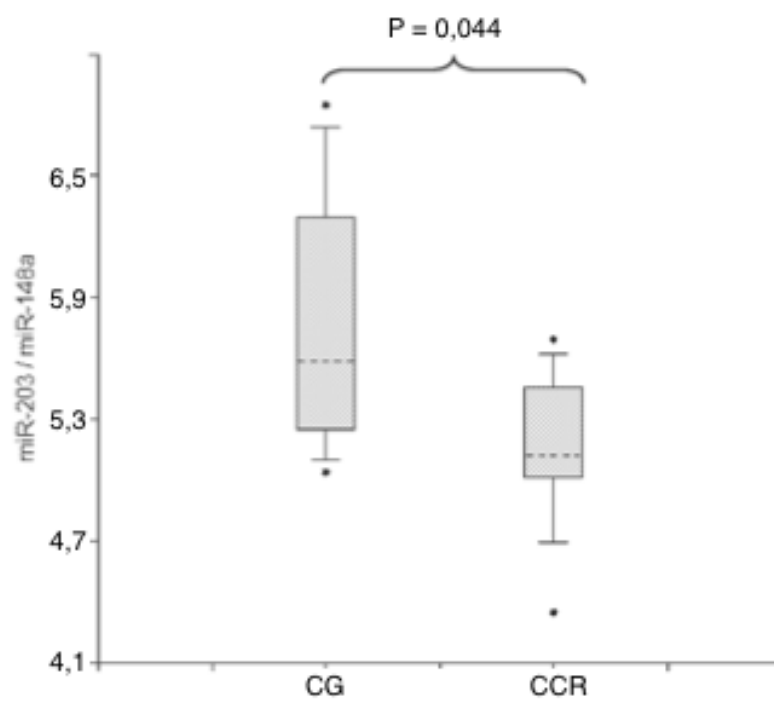


Figura 18F

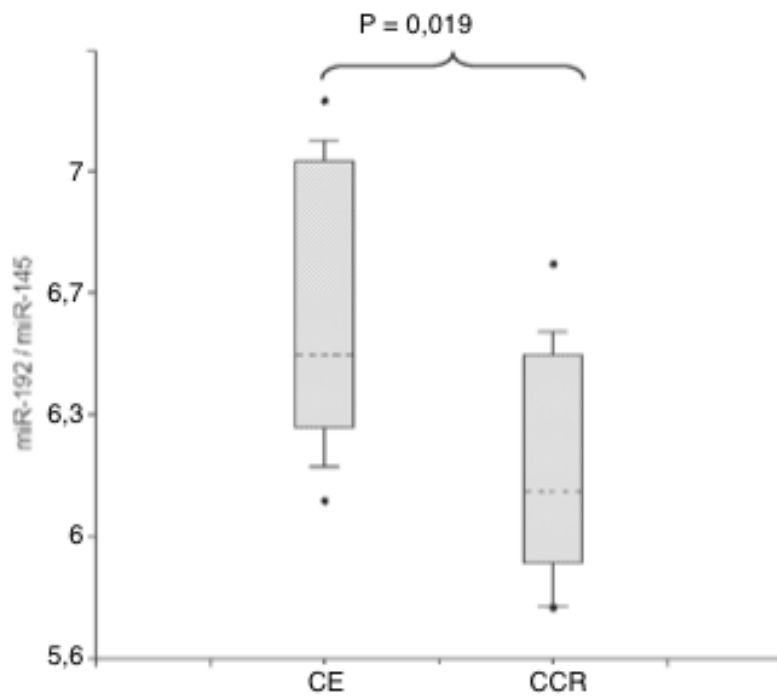


Figura 18G

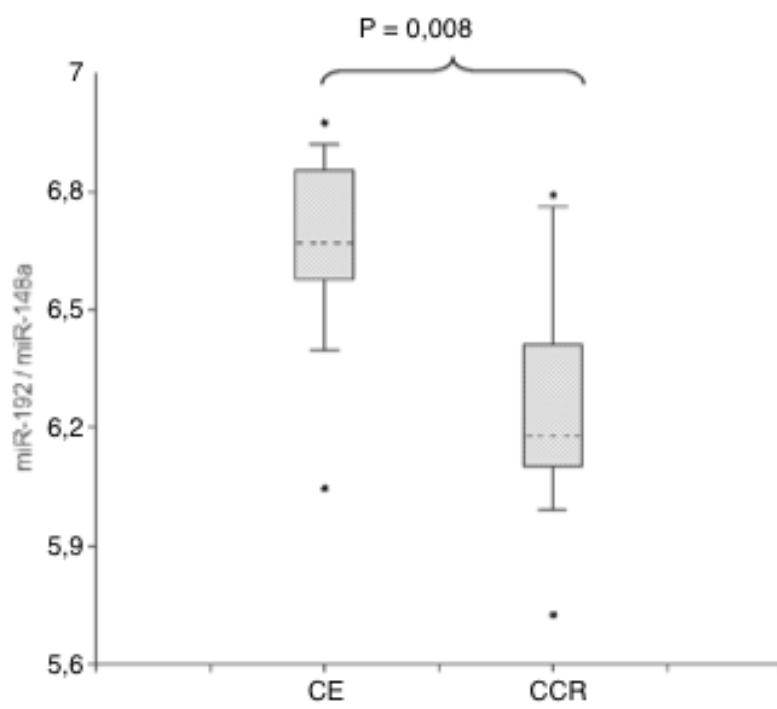


Figura 18H

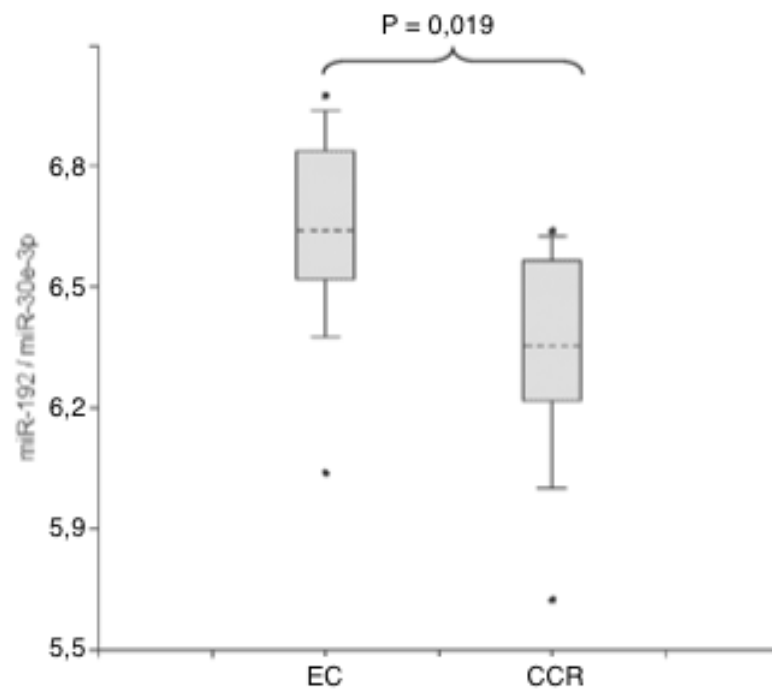


Figura 18I

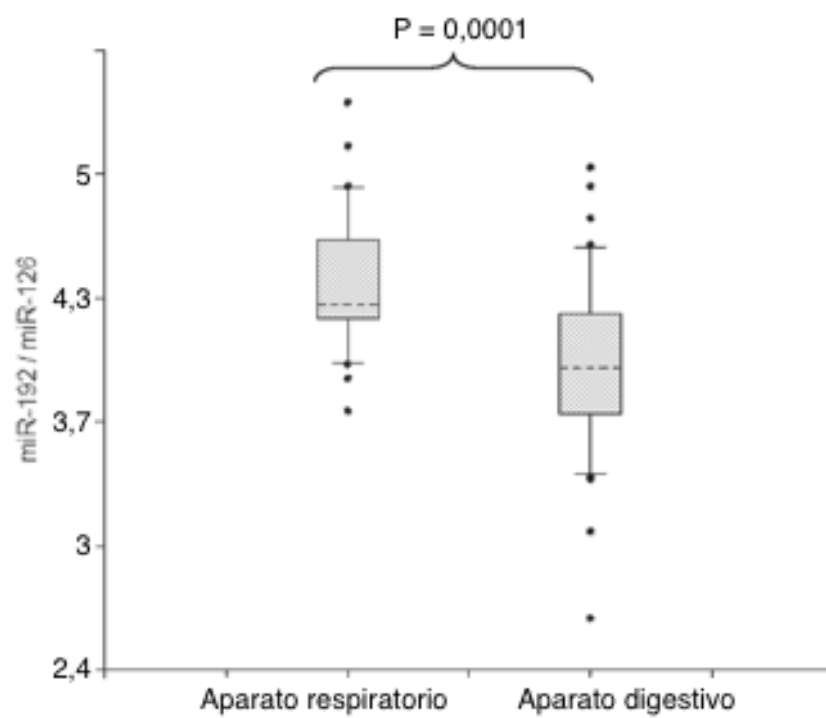


Figura 19A

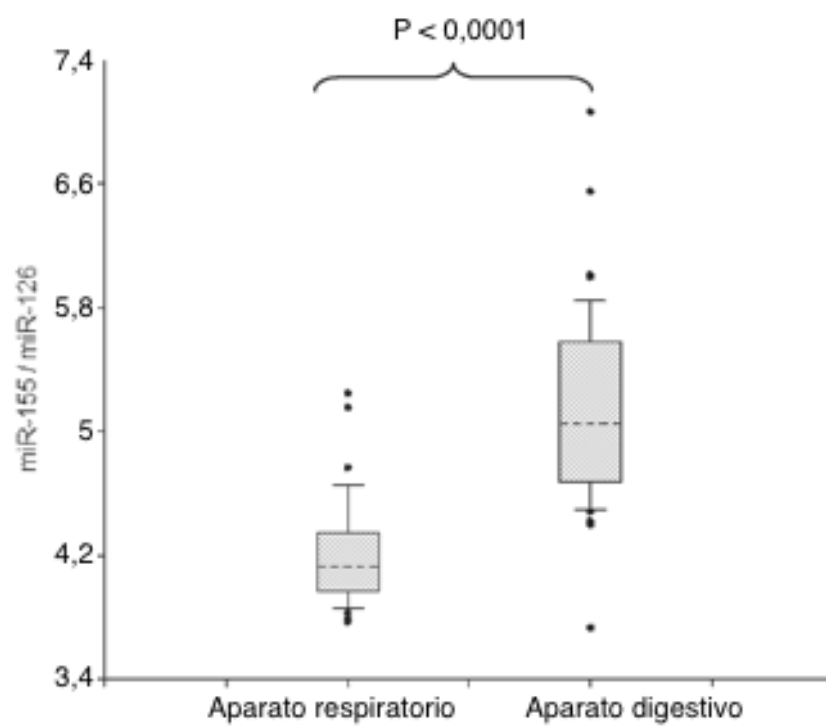


Figura 19B

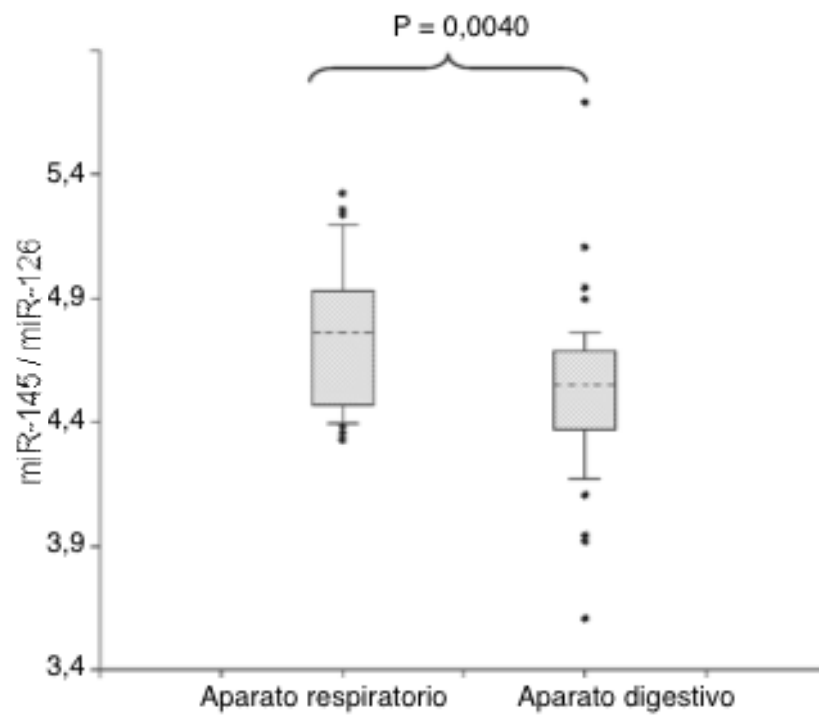


Figura 19C

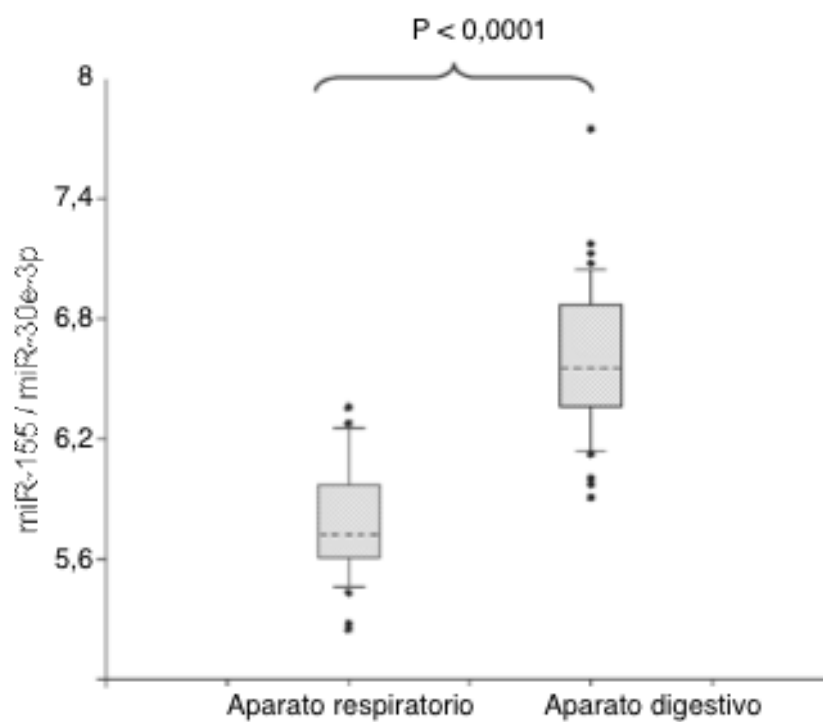


Figura 19D

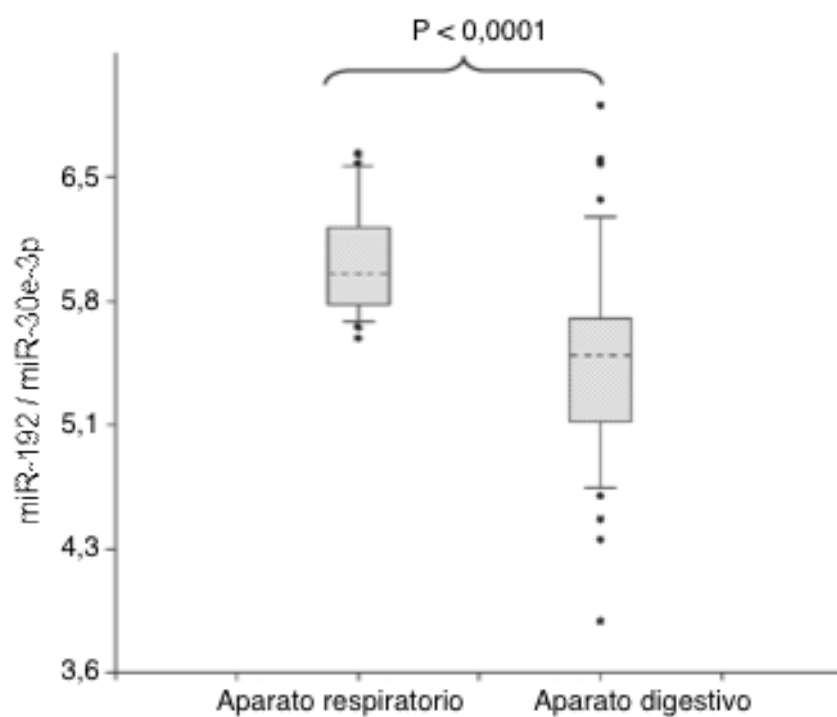


Figura 19E

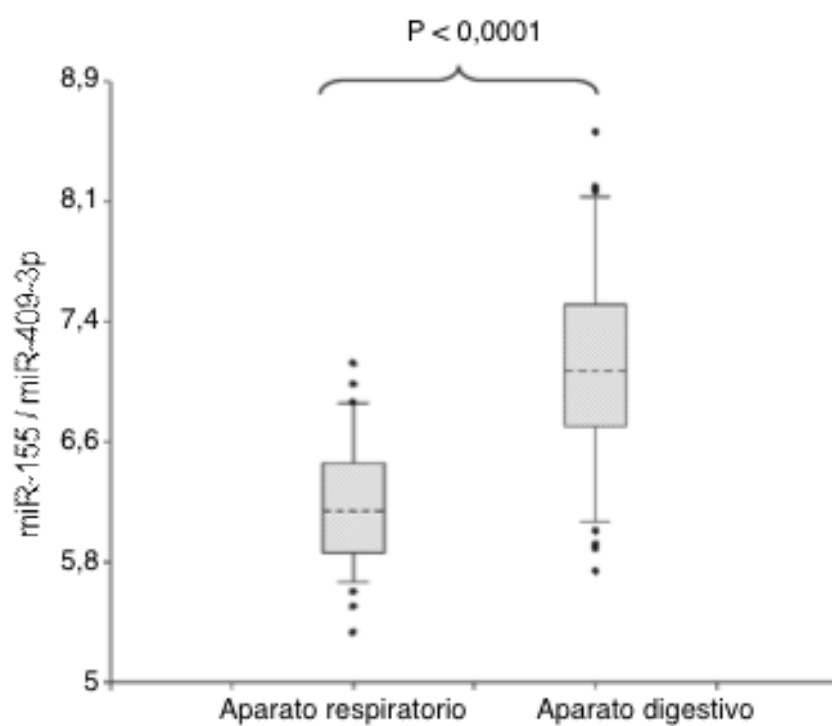


Figura 19F

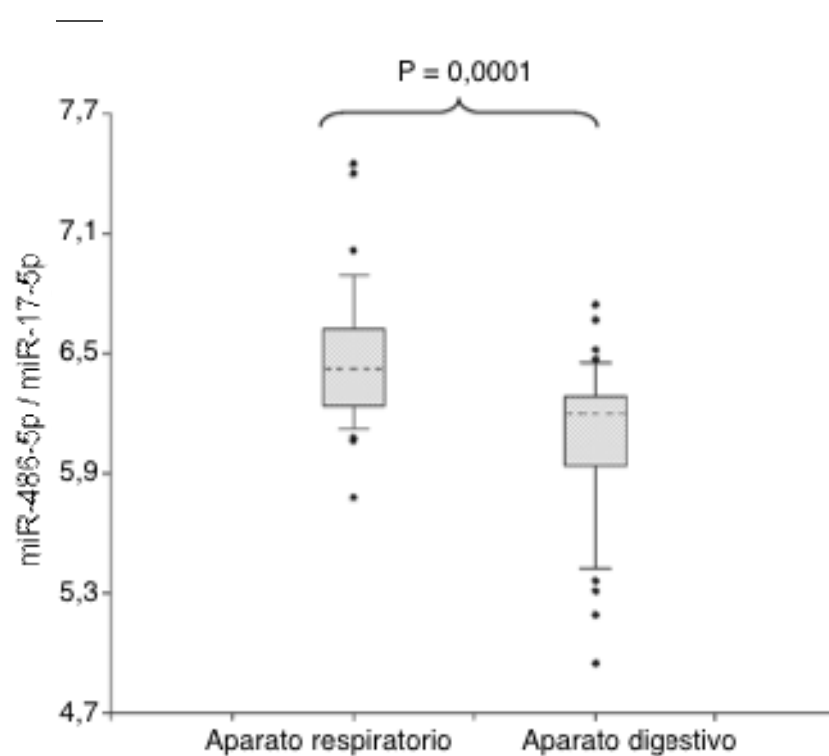


Figura 19G

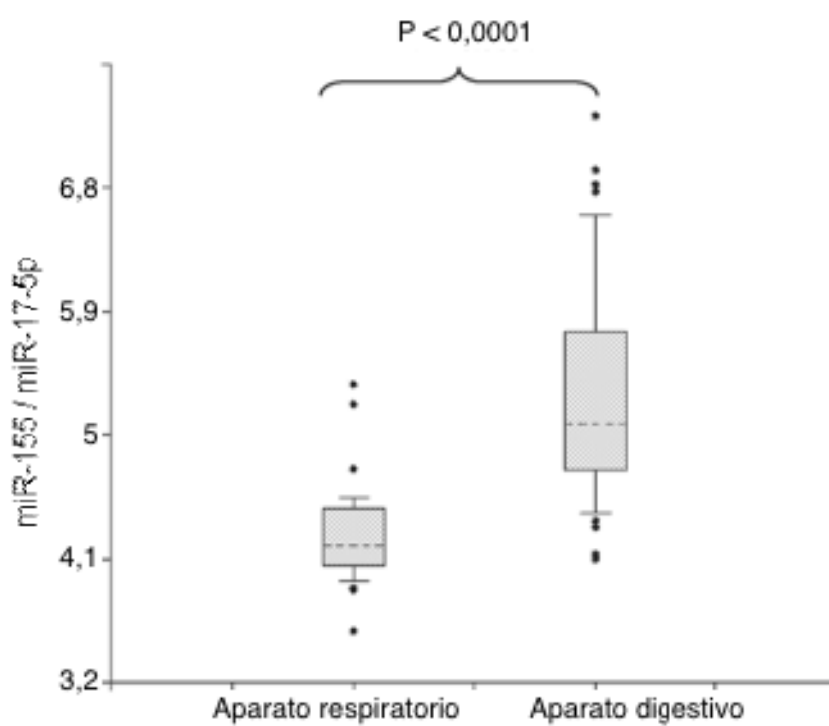


Figura 19H

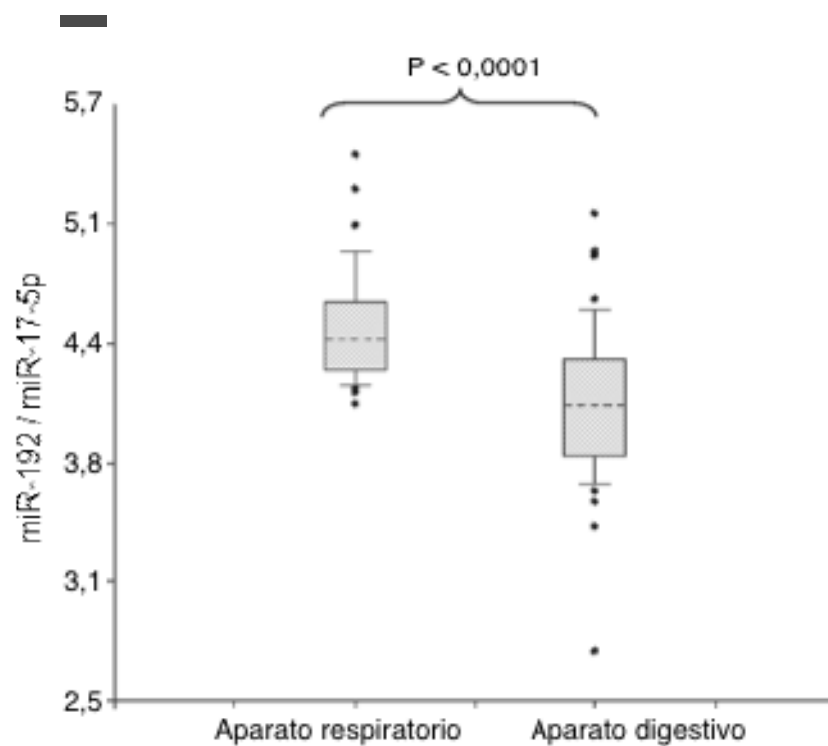


Figura 19I

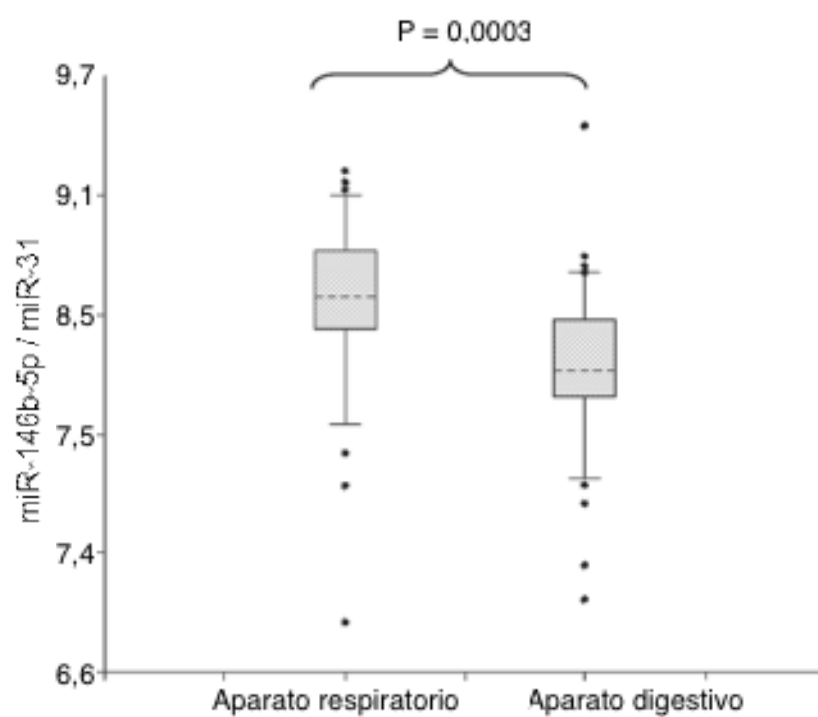


Figura 19J

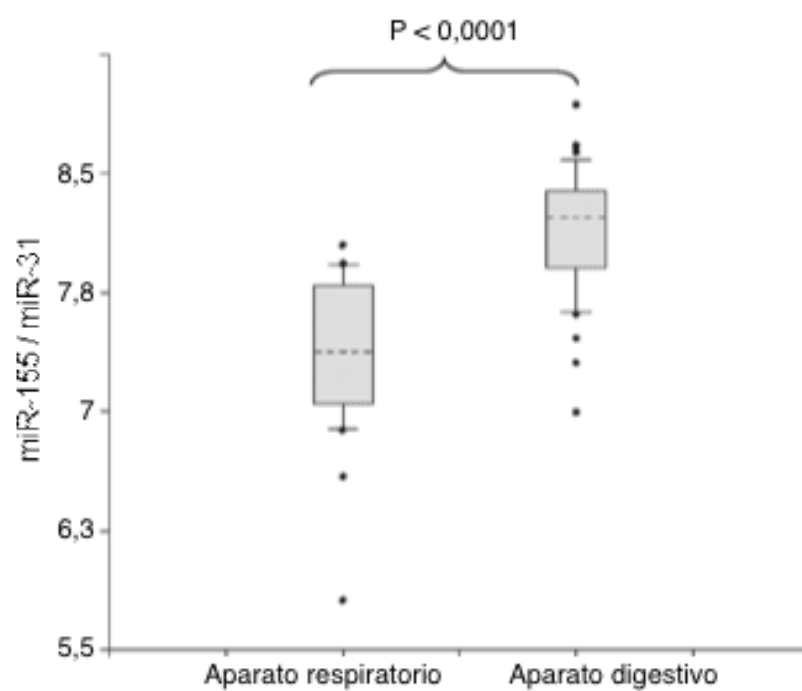


Figura 19K

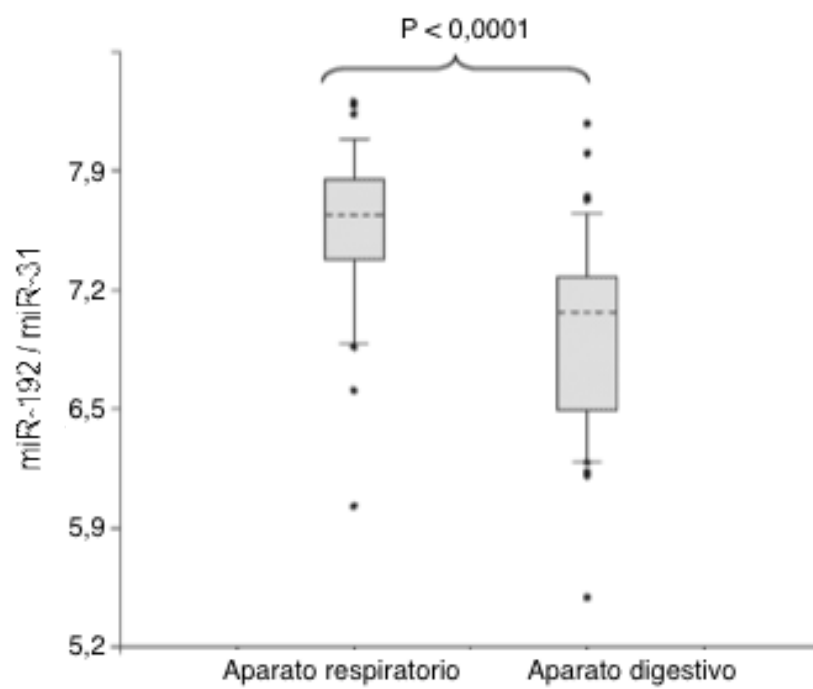


Figura 19L

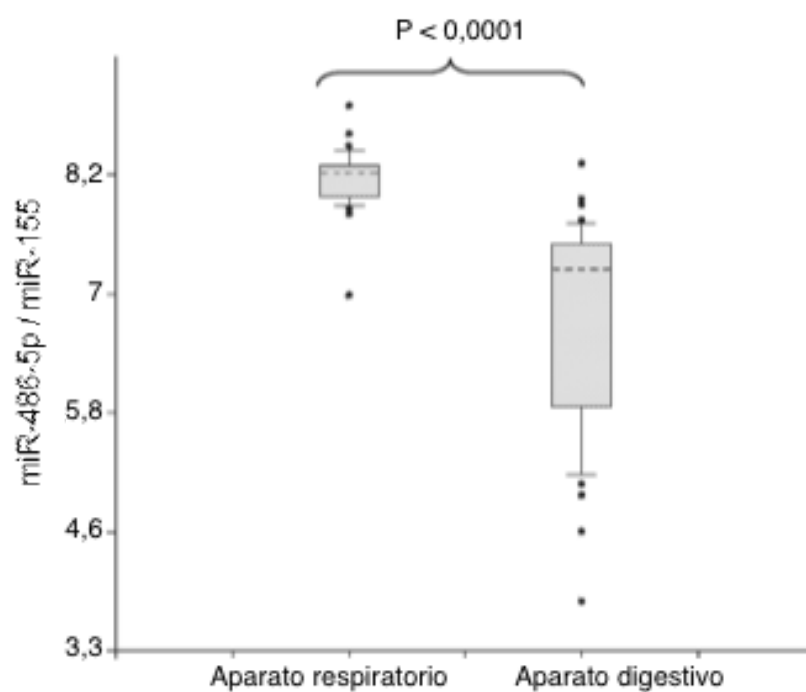


Figura 19M

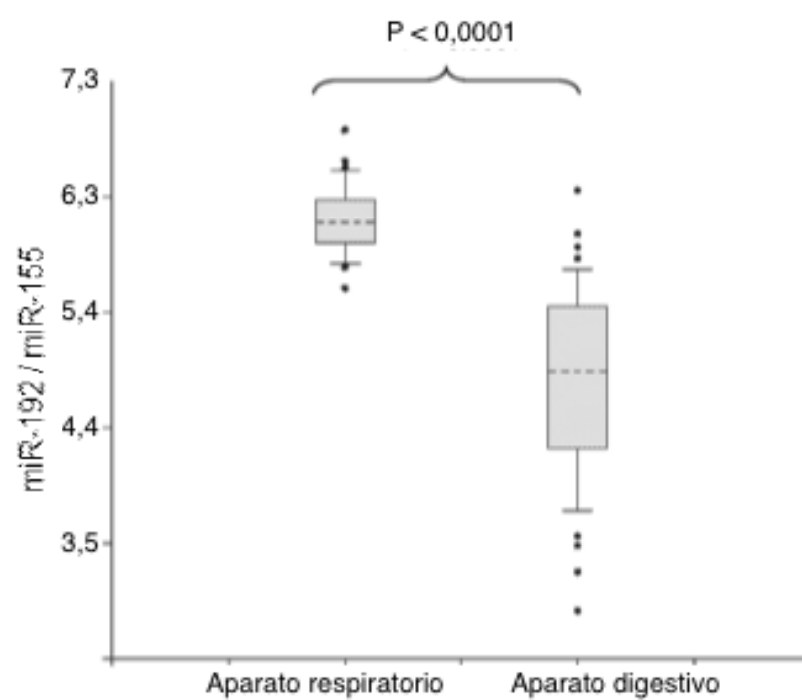


Figura 19N

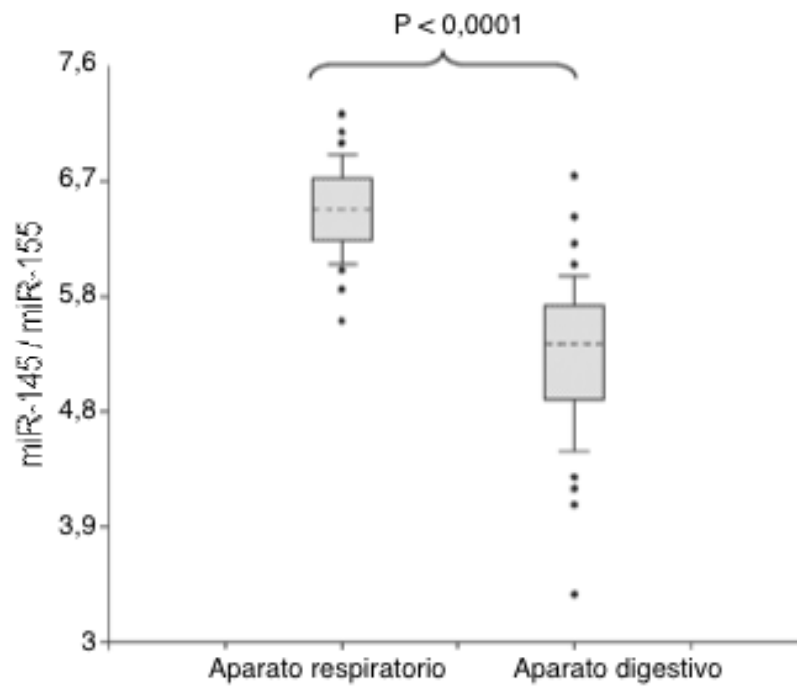


Figura 190

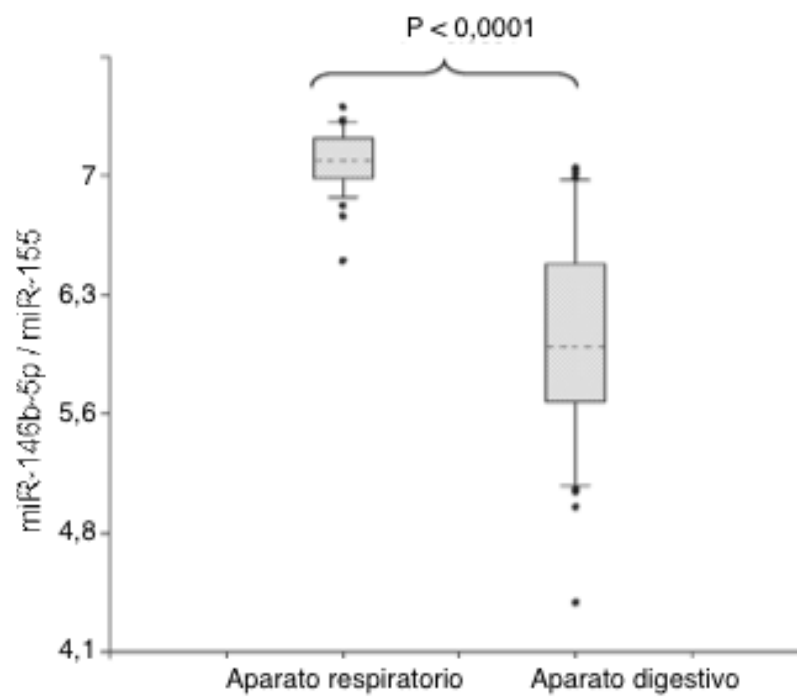


Figura 19P

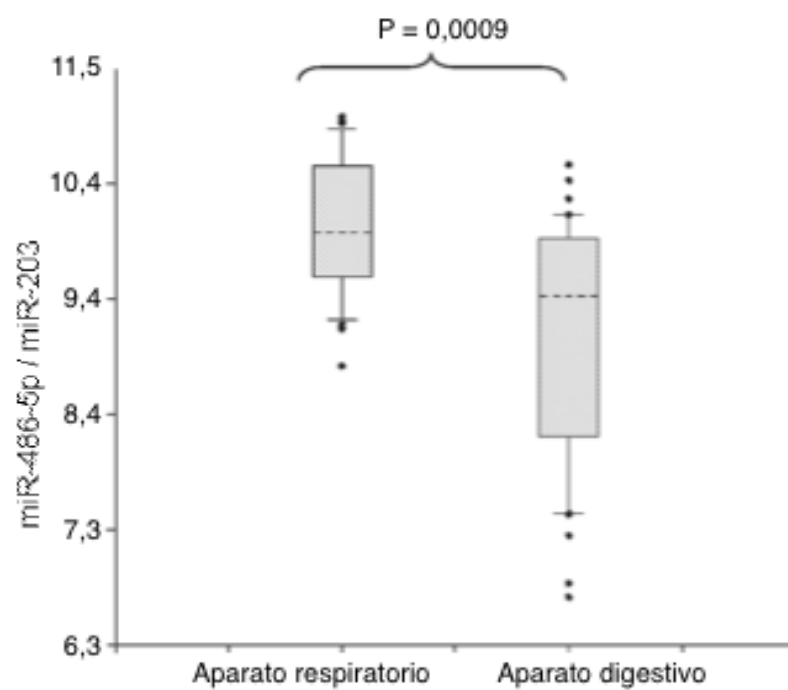


Figura 19Q

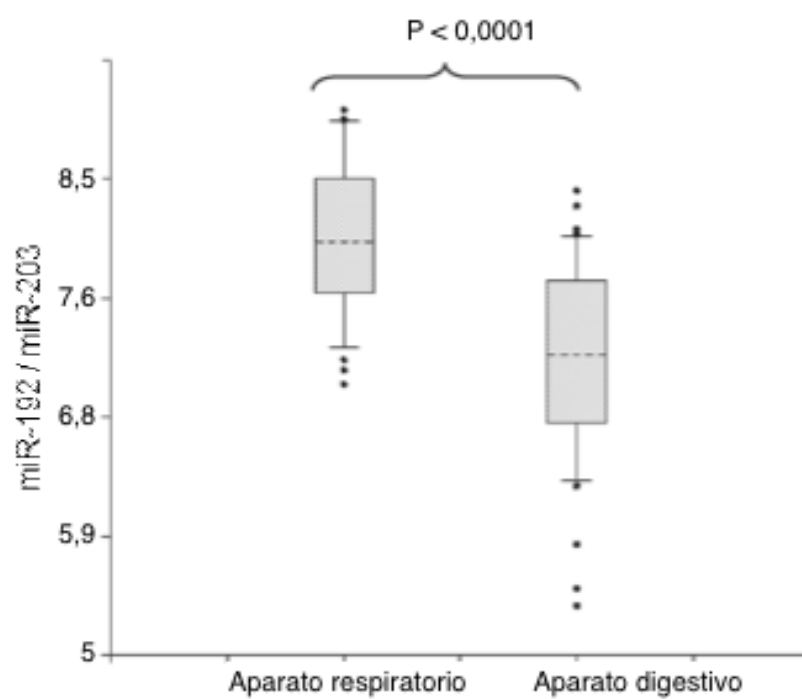


Figura 19R

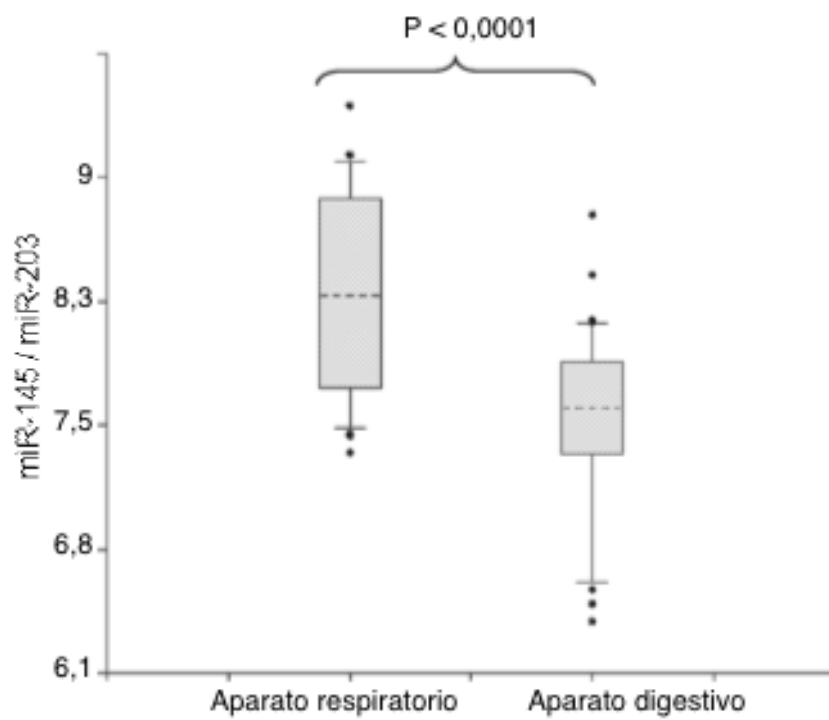


Figura 19S

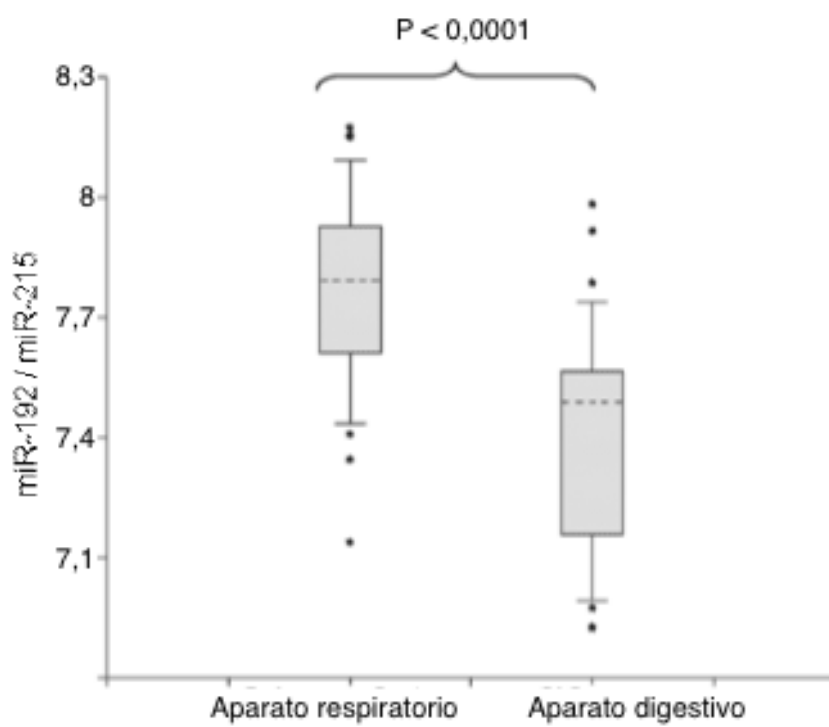


Figura 19T

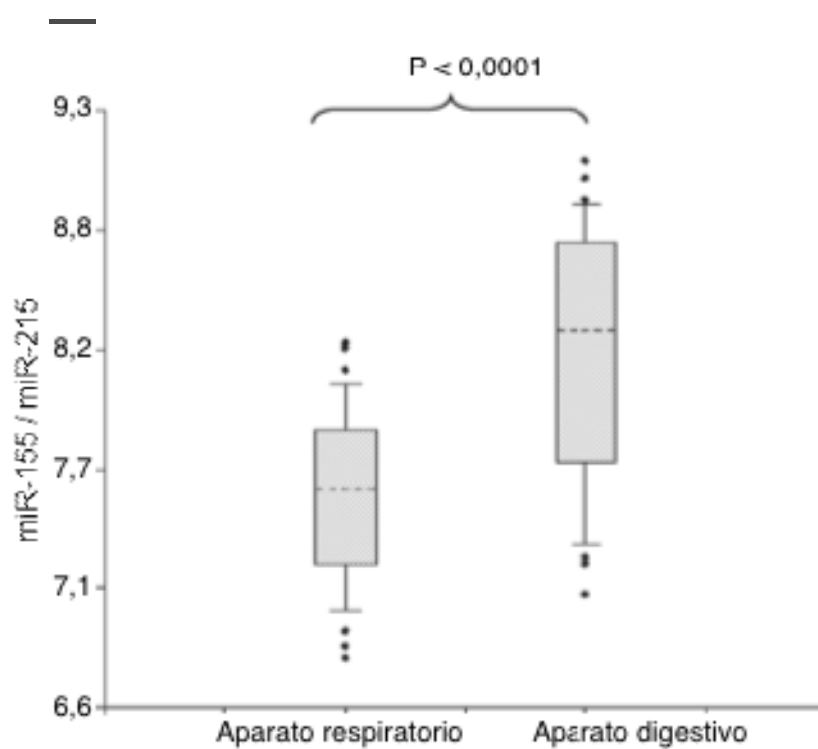


Figura 19U

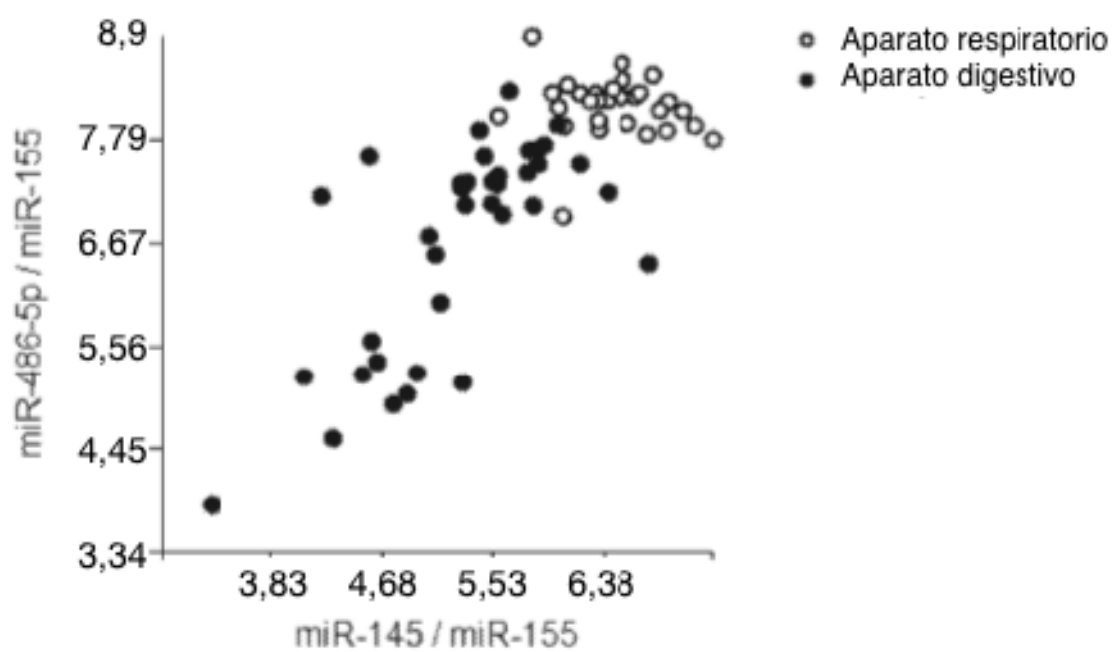


Figura 19V

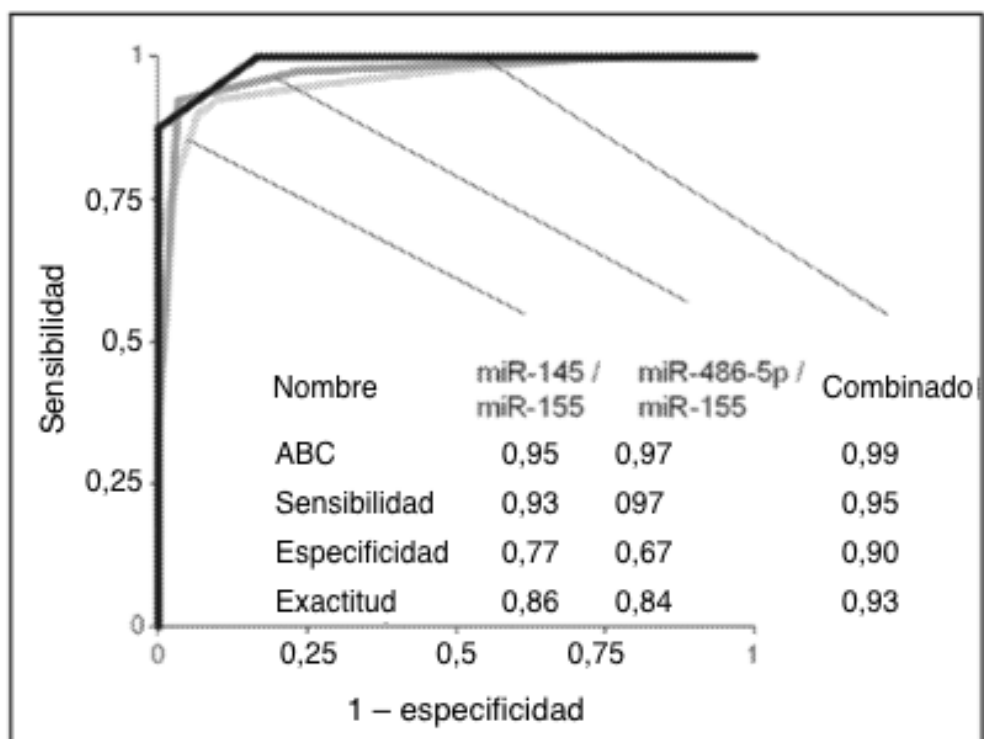


Figura 19W

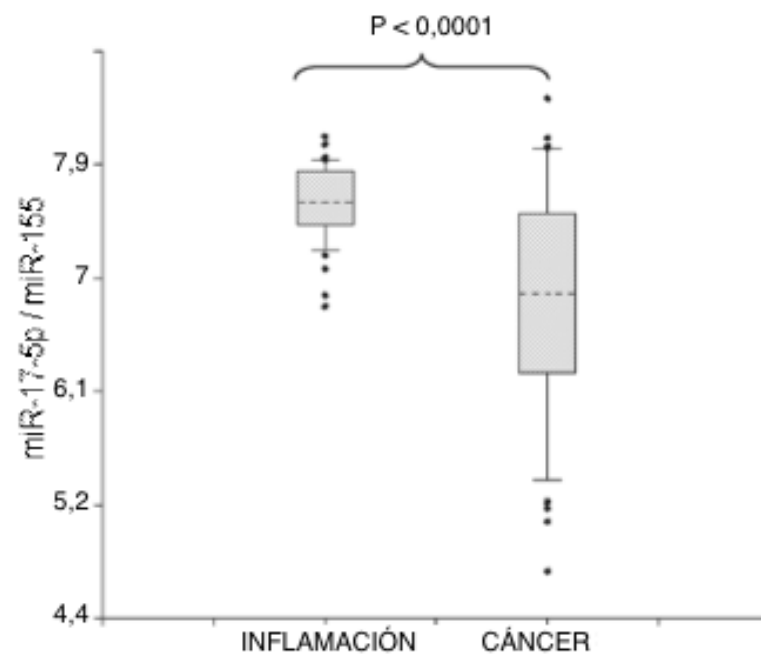


Figura 20A

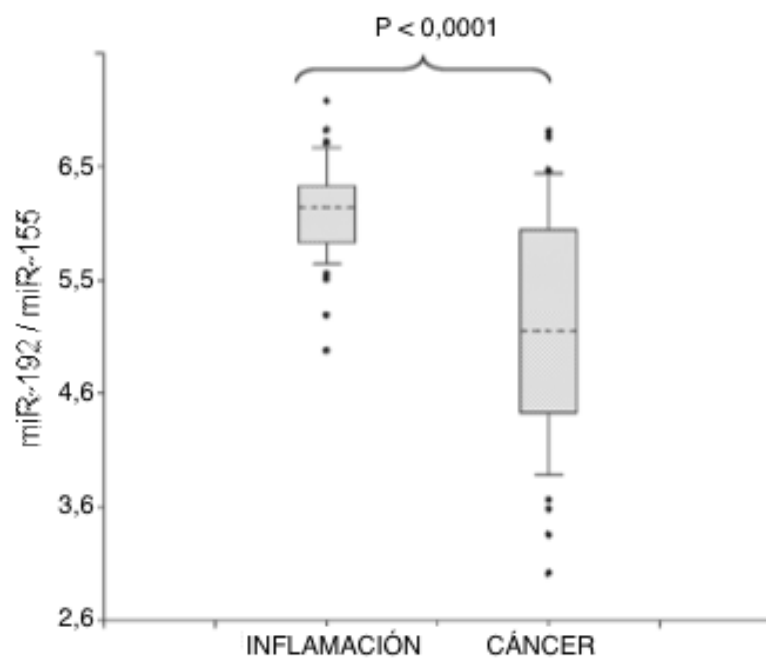


Figura 20B

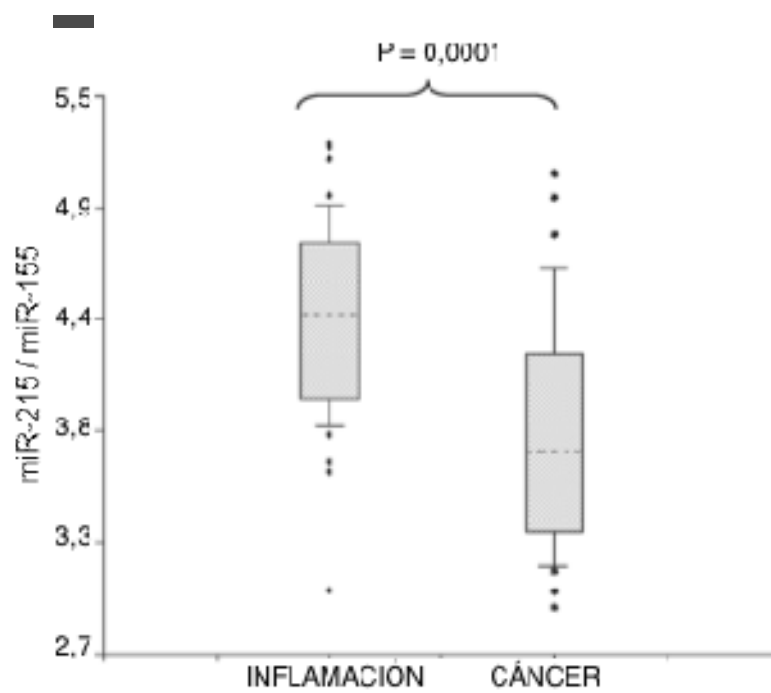


Figura 20C

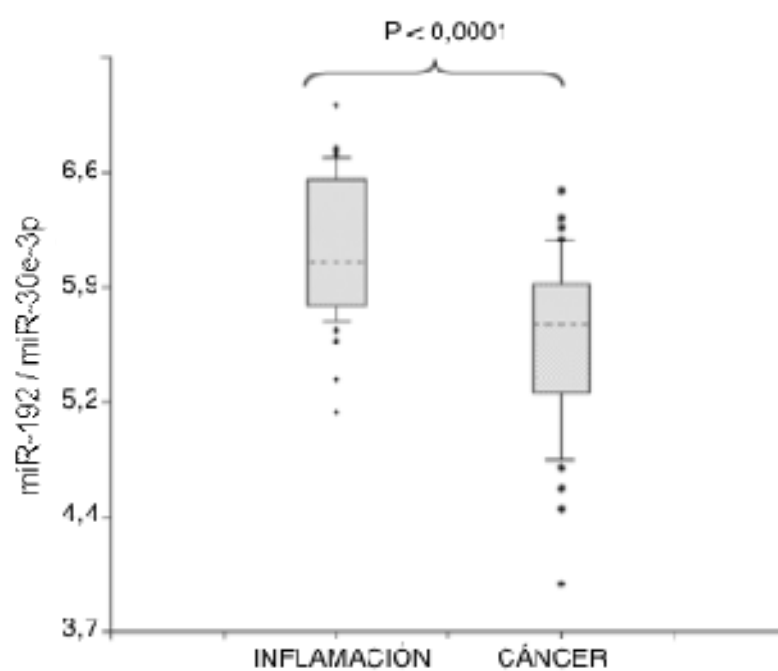


Figura 20D

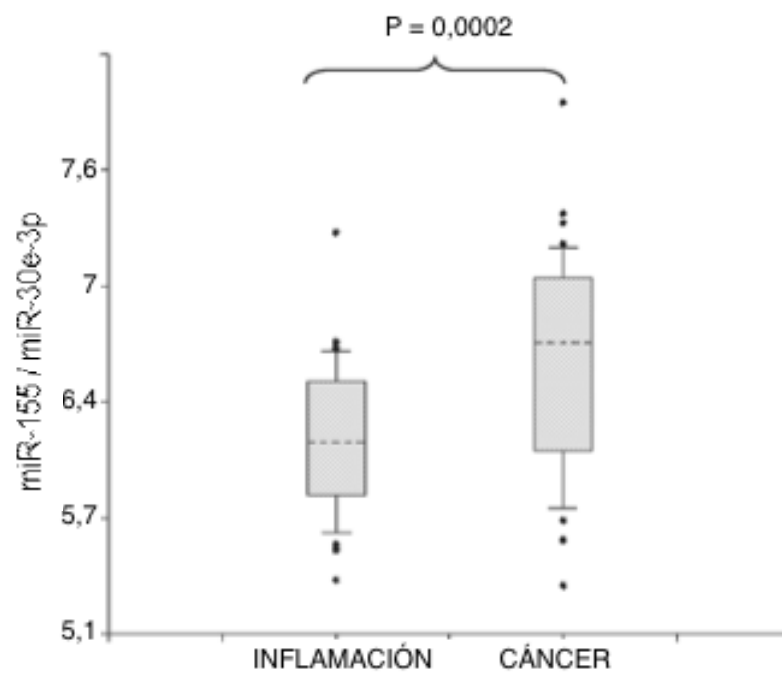


Figura 20E

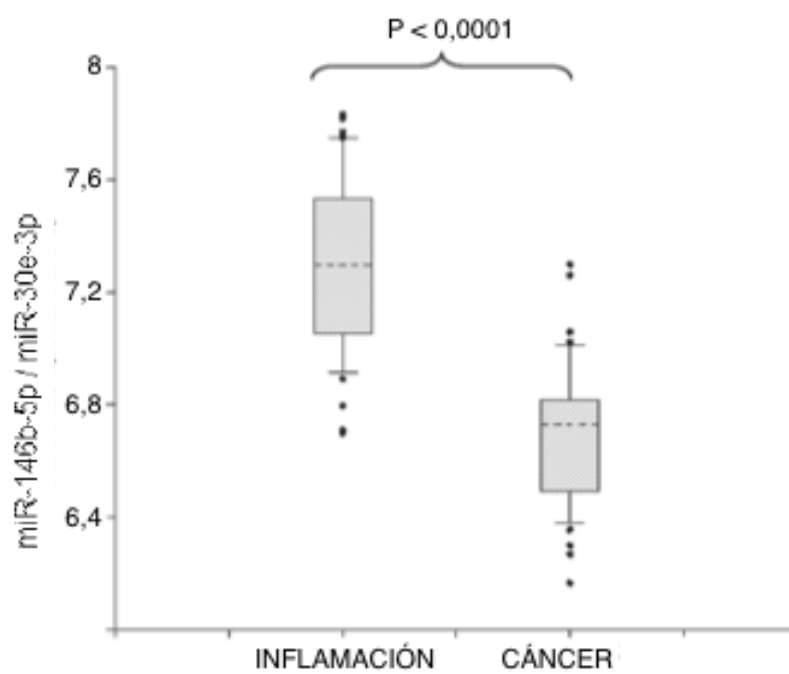


Figura 20F

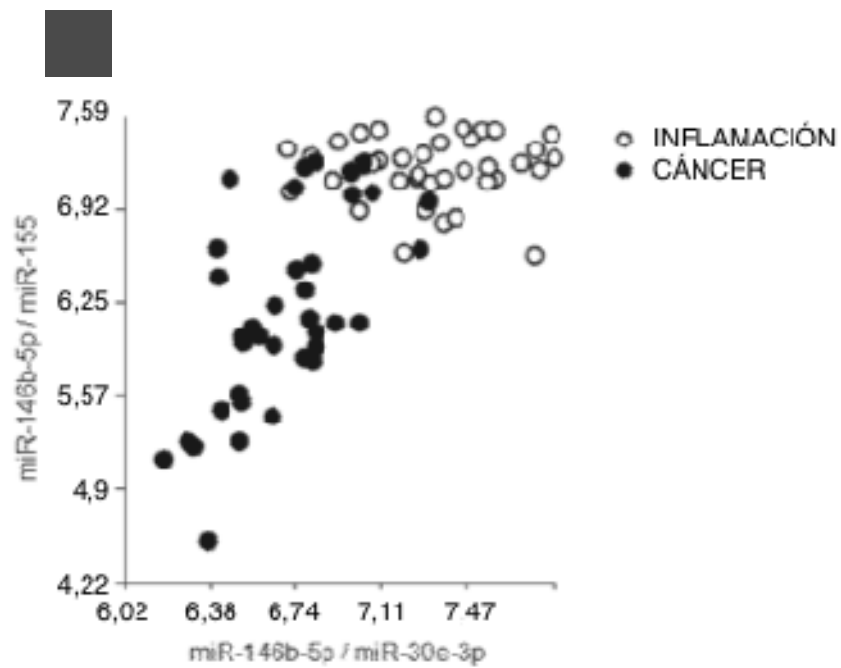


Figura 20G

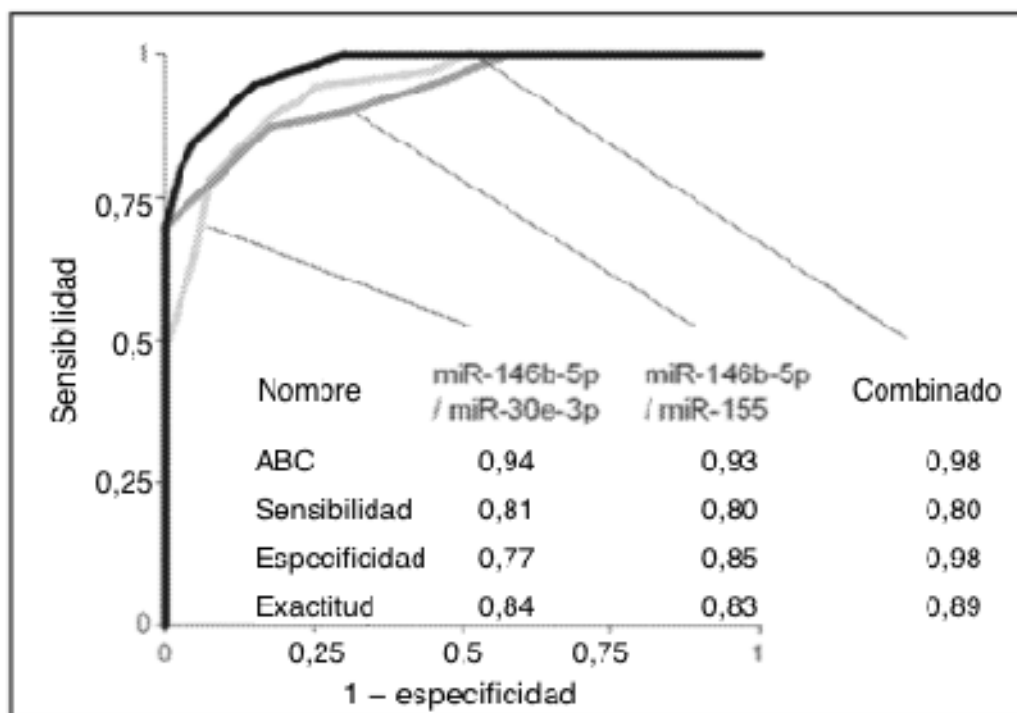


Figura 20H

PROCEDIMIENTO DE APRENDIZAJE DE BIOMARCADORES PARA UNA ENFERMEDAD CONCRETA

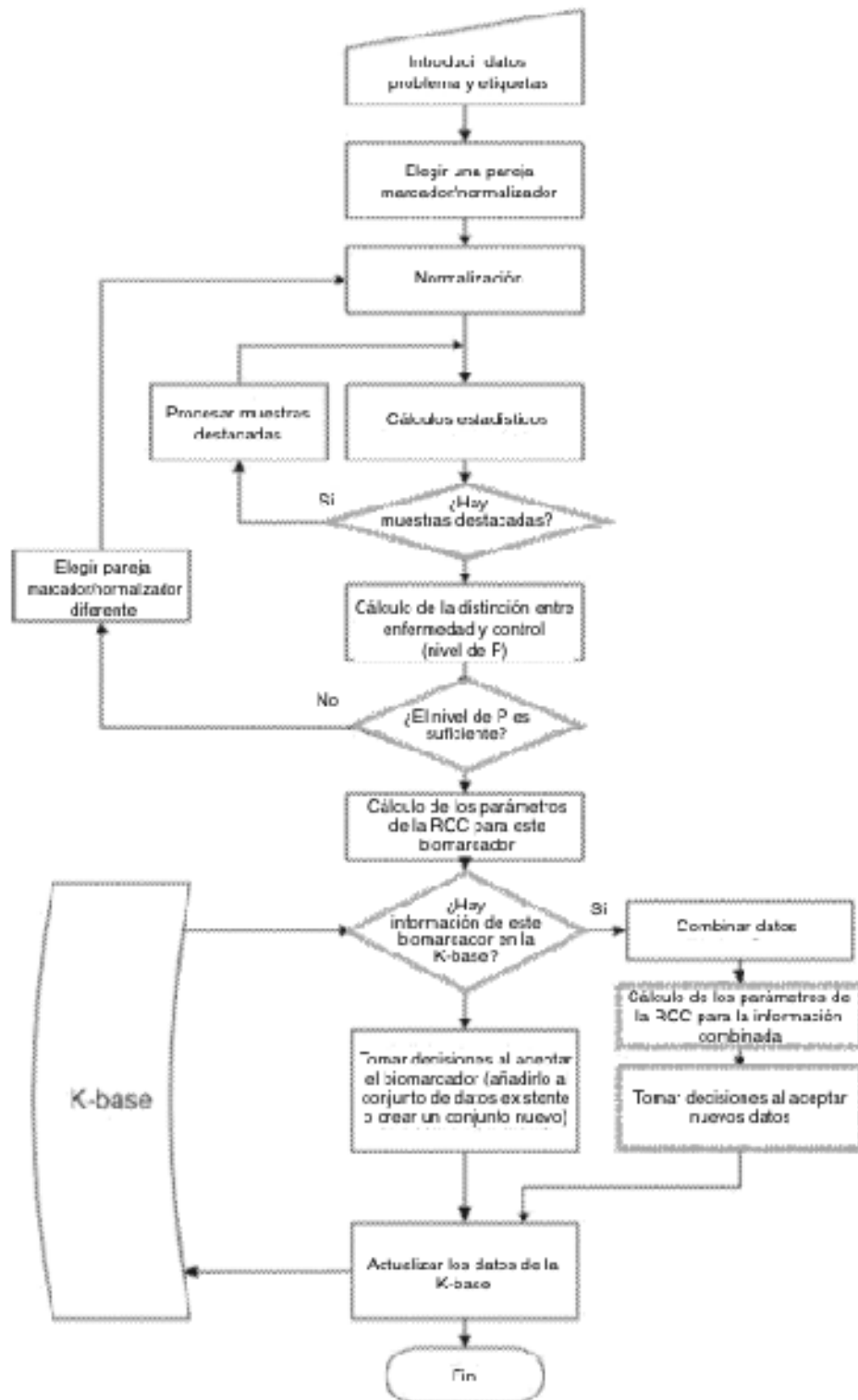


Figura 21A

PROCEDIMIENTO DE CLASIFICACIÓN PARA LAS ENFERMEDADES DESEADAS

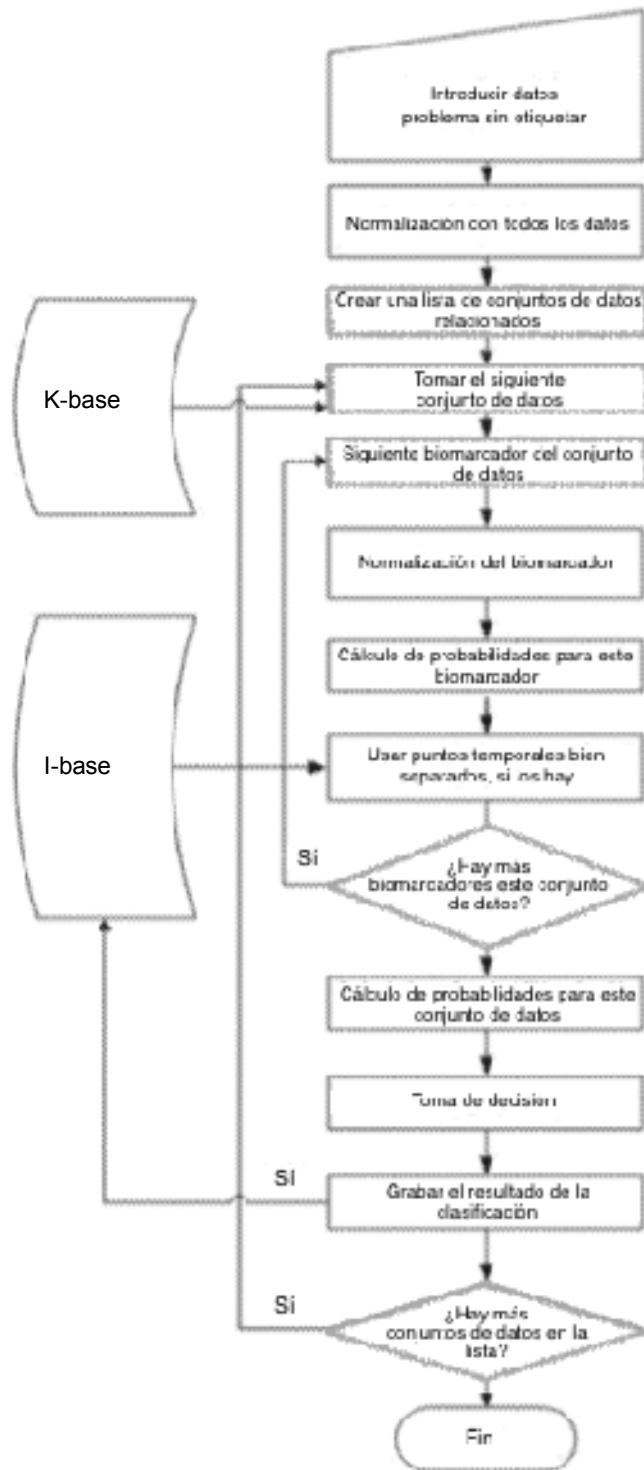


Figura 21B