

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 785**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008 E 13161985 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2612926**

54 Título: **Métodos de uso de ARNmi para la detección de la muerte de células in vivo**

30 Prioridad:

22.08.2007 US 965871 P

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

26.03.2018

73 Titular/es:

**TROVAGENE, INC. (100.0%)
11055 Flintkote Avenue
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 660 785 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de uso de ARNmi para la detección de la muerte de células *in vivo*

5 Campo de la invención

La invención proporciona métodos no invasivos para el aislamiento y la detección de secuencias de microARN (miARN) en el fluido corporal. Más específicamente, la presente invención abarca métodos para detectar la muerte celular *in vivo* analizando la orina y otros fluidos corporales para determinar los niveles de miARN para el diagnóstico clínico y la monitorización del tratamiento.

10

Antecedentes de la invención

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

15

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

20

25

30

Independientemente de un mecanismo específico y del tipo de muerte celular, los métodos para detectar tipos de células que mueren son importantes para el diagnóstico de diversas enfermedades, críticas para el monitoreo de la enfermedad y el tratamiento, y útiles para el diagnóstico diferencial. Además, los métodos capaces de detectar la muerte celular específica *in vivo* son útiles para desarrollar fármacos dirigidos a la prevención o inducción de la muerte celular, así como para el análisis de la citotoxicidad de los fármacos recientemente desarrollados.

40

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

45

50

Es bien conocido que la apoptosis, o muerte celular programada, que es una forma principal de muerte celular en el organismo mamífero, está acompañada por la fragmentación internucleosómica del ADN nuclear. Muchos laboratorios han demostrado que una porción de este ADN aparece en la sangre (Lo Y.M. Ann NY Acad Sci. 945: 1-7 (2001); Lichtenstein et al., Ann NY Acad Sci. 945: 239-249 (2001); Taback et al., Curr Opin Mol Ther. 6: 273-278 (2004); Bischoff et al., Hum Reprod Update. 8: 493-500, (2002)). También se ha demostrado que este ADN fragmentado, denominado ADN transrenal (ADNtr) cruza la barrera renal y se puede detectar en la orina. (Botezatu et al., Clin Chem. 46: 1078-1084, (2000); Su et al., J Mol Diagn. 6: 101-107 (2004); Su et al., Ann NY Acad Sci. 1022: 81-89 (2004)).

60

El documento US 6251638 B1 se refiere a un método no invasivo para detectar ADN en orina con el fin de detectar la secuencia de ADN fetal.

65

Aunque tanto el ADN plasmático libre como el ADNtr pueden usarse como herramientas de diagnóstico, proporcionan

un enfoque bastante limitado cuando se evalúan los eventos específicos de los tejidos, tales como la muerte celular. Por lo tanto, los métodos analíticos que no son invasivos y proporcionan una gama más amplia de indicaciones de patología específica, debido a su capacidad para detectar niveles de células que mueren en tejidos y órganos particulares, serían útiles para diagnosticar y controlar el estado de diversas enfermedades o condiciones patológicas en pacientes. Además, los métodos analíticos específicos de tejido que proporcionan los medios para controlar la respuesta de un paciente a una terapia de enfermedad serían útiles para determinar la eficacia de la terapia, y en el caso del tratamiento con fármaco, la dosis óptima requerida para la administración del fármaco.

J. Kempainen et al. "miRNA as Biomarkers on Blood and other Biofluids", Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology Poster Abstracts, Colorado, 28 de enero de 2007, se refiere al uso de perfiles de expresión de biomarcadores de miARN para clasificar a los pacientes con cáncer.

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

Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para medir la muerte celular *in vivo* mediante la detección de miARN específicos de tejido, característicos de una infección por patógeno, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson, en fluidos corporales, tales como, por ejemplo, suero y orina. Los presentes métodos basados en la detección de miARN en fluidos corporales se usan para el desarrollo posterior de pruebas de diagnóstico o monitoreo.

Sumario de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a un método novedoso para detectar y medir la muerte celular *in vivo* mediante el análisis de niveles de secuencias específicas de miARN en ácidos nucleicos libres de células obtenidas a partir de fluidos corporales, dicho miARN procedente de células que mueren en todo el cuerpo y utilizando el resultado analítico obtenido para determinar el estado de una enfermedad o condición médica anormal en un paciente.

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

La presente invención proporciona un método para detectar y medir la muerte celular *in vivo*, comprendiendo el método:

(a) analizar niveles de secuencias específicas de miARN en ácidos nucleicos libres de células obtenidas de una muestra de fluido corporal de un paciente, en donde la muestra de fluido corporal se selecciona de sangre, suero y orina, siendo dichas secuencias de miARN indicativas de muerte celular *in vivo* y provenientes de células que mueren en todo el cuerpo del paciente; y

(b) determinar el estado de una enfermedad o condición médica anormal en el paciente,

en donde dicha enfermedad o condición médica anormal es:

- (i) una infección por patógeno, preferiblemente en la que el patógeno es un virus y más preferiblemente en donde el virus es un virus de Epstein-Barr;
- (ii) un accidente cerebrovascular;
- (iii) enfermedad de Alzheimer; o
- (iv) enfermedad de Parkinson.

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

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

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

El método de la presente invención implica detectar miARN libres de células, como un marcador específico para el trastorno específico asociado con la muerte celular excesiva o insuficiente en un tejido u órgano. Dicho trastorno es una infección por patógeno. Preferiblemente, dicho patógeno es un virus. Más preferiblemente, dicho virus es un virus de Epstein-Barr. Alternativamente, dicho trastorno es un accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.

La presente invención proporciona además un método de control de una enfermedad y/o tratamiento en un paciente mediante análisis cuantitativo de miARN específicos libres de células en una muestra de orina, comprendiendo el método:

(a) obtener periódicamente una muestra de orina de un paciente, siendo dichas secuencias de miARN indicativas de muerte celular *in vivo* y que se originan en células que mueren en todo el cuerpo del paciente; y
(b) analizar dicha muestra para una o más secuencias específicas de miARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho análisis comprende detectar dichas una o más secuencias específicas de miARN con sonda o sondas y/o sonda o sondas que son sustancialmente complementarias a una parte de dichas secuencias específicas de miARN,

en donde dicha monitorización de la enfermedad y/o del tratamiento de la misma es:

(i) una infección por patógeno, preferiblemente en la que el patógeno es un virus y más preferiblemente en la que el virus es un virus de Epstein-Barr;
(ii) un accidente cerebrovascular;
(iii) enfermedad de Alzheimer; o
(iv) enfermedad de Parkinson.

La presente invención proporciona además un método para detectar y medir miARN que se origina a partir de un tipo específico de célula, tejido u órgano en el cuerpo de un paciente, comprendiendo el método:

(a) analizar los niveles de secuencias específicas de miARN en ácidos nucleicos libres de células obtenidas de una muestra de fluido corporal de un paciente, en la que la muestra de fluido corporal se selecciona de sangre, suero y orina, dichas secuencias de miARN se originan en un tipo de célula específico, tejido u órgano en el paciente; y
(b) detectar alteraciones en el nivel de secuencias específicas de miARN que son indicativas de patología crónica, o el efecto citotóxico de agentes físicos o químicos,

en donde la patología crónica se selecciona de demencia frontotemporal, insuficiencia cardíaca crónica asociada con la muerte de cardiomiocitos, enfisema asociado con la muerte de células pulmonares, diabetes tipo 1 asociada con la muerte de células beta pancreáticas, glomerulonefritis asociada con la muerte de células renales y muerte celular en órganos o tejidos infectados de forma crónica.

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción más particular de las realizaciones de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos. Los dibujos no son necesarios para escalamiento, poniendo más bien énfasis en ilustrar los principios de la invención.

La Figura 1 es una fotografía de una electroforesis en gel de poliacrilamida de ácidos nucleicos extraídos de orina filtrada usando Q-Sepharose^{MR}.

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

Las Figuras 3A a 3G son representaciones gráficas puntuales de las concentraciones normalizadas de miARN en muestras de orina de pacientes en los puntos de tiempo de 12 y 24 horas después del accidente cerebrovascular.

La Figura 4 es un diagrama que representa la correlación entre los cambios en las concentraciones de los miARN 129 y

219 y el resultado del accidente cerebrovascular. Los pacientes etiquetados como \circ y \square mejoraron su estado clínico un mes después del accidente cerebrovascular, y el estado clínico del paciente etiquetado \times se deterioró un mes después de un accidente cerebrovascular.

5 La Figura 5 es una representación gráfica puntual de las concentraciones normalizadas de miARN en muestras de orina sin filtrar de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles de la misma edad.

La Figura 6 es una representación gráfica puntual de las concentraciones normalizadas de miARN en muestras de orina filtrada de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles de la misma edad.

10 La Figura 7 es una representación gráfica puntual de las concentraciones normalizadas de miARN en muestras de suero de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles de la misma edad.

15 La Figura 8 es una representación gráfica puntual de las concentraciones normalizadas de miARN en muestras de orina de pacientes con la enfermedad de Parkinson y controles de la misma edad.

La Figura 9 es una representación gráfica puntual de la concentración normalizada de miRNA-9 en muestras de orina de mujeres embarazadas con síndrome de Down y fetos normales.

20 Descripción detallada de la invención

La tecnología de esta invención se basa en el descubrimiento de que los ARN pequeños, en particular los microARN específicos (miARN), incluidos los miARN transrenales (miARNtr), se presentan en fluidos corporales y sus concentraciones reflejan la muerte celular asociada con daño orgánico u otra patología. La presencia de estas secuencias de ácido nucleico a niveles más bajos o más altos que los de un grupo de control es, por lo tanto, una indicación de que es probable que exista una anomalía o afección patológica en el paciente de quien se obtuvo la muestra.

25 Los métodos de la presente invención ofrecen mejoras sobre los métodos previos de diagnóstico, detección y monitorización debido a su naturaleza intrínsecamente no invasiva.

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

35 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se inicia la extensión del cebador. Un "cebador" de oligonucleótidos puede ocurrir de forma natural, tal como en un dígesto de restricción purificado o puede producirse sintéticamente.

40 Se selecciona un cebador para que sea "sustancialmente" complementario a una cadena de secuencia específica de la plantilla. Un cebador debe ser suficientemente complementario para hibridar con una cadena molde para que se produzca la elongación del cebador. Una secuencia de cebador no necesita reflejar la secuencia exacta de la plantilla. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario se puede unir al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador sustancialmente complementario a la cadena. Las bases no complementarias o las secuencias más largas pueden intercalarse en el cebador, con la condición de que la secuencia del cebador tenga una complementariedad suficiente con la secuencia de la plantilla para hibridarse y formar así un complejo cebador de plantilla para la síntesis del producto de extensión del cebador.

Un ácido nucleico "objetivo" es una secuencia de miARN a evaluar por hibridación, amplificación o cualquier otro medio de análisis de una secuencia de ácido nucleico, que incluye una combinación de métodos de análisis.

50 Los métodos de "hibridación" implican el apareamiento de una secuencia complementaria con el ácido nucleico objetivo (la secuencia a analizar). La capacidad de dos polímeros de ácido nucleico que contienen secuencias complementarias para encontrarse entre sí y aparearse a través de la interacción de emparejamiento de bases es un fenómeno bien reconocido. Las observaciones iniciales del proceso de "hibridación" por Marmur y Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46: 453 (1960) y Doty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46: 461 (1960) fue seguido por el refinamiento de este proceso en una herramienta esencial de la biología moderna. La hibridación abarca, pero no se limita a, técnicas de hibridación de ranura, punto y transferencia.

60 Es importante para algunas aplicaciones de diagnóstico determinar si la hibridación representa una complementariedad completa o parcial. Por ejemplo, cuando se desea detectar simplemente la presencia o ausencia de miARN del patógeno, solo es importante que el método de hibridación asegure la hibridación cuando la secuencia relevante está presente; las condiciones se pueden seleccionar cuando se hibridan tanto las sondas parcialmente complementarias como las sondas completamente complementarias. Sin embargo, otras aplicaciones de diagnóstico pueden requerir que el método de hibridación distinga entre complementariedad parcial y completa. Puede ser de interés detectar polimorfismos genéticos.

65 El término "sonda" como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de

nucleótidos), ya sea que se produzca de forma natural como en un digesto de restricción purificado o producido sintéticamente, que forma una estructura dúplex u otro complejo con una secuencia de otro ácido nucleico, debido a la complementariedad u otros medios de interacción atractiva reproducible, de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en el otro ácido nucleico. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias génicas particulares. Se contempla que cualquier sonda usada en la presente invención se marcará con cualquier "molécula informadora", de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección, que incluye, pero no se limita a, una enzima (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), sistemas fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. Se contempla además que el oligonucleótido de interés (es decir, que se va a detectar) se marcará con una molécula indicadora. También se contempla que tanto la sonda como el oligonucleótido de interés serán marcados. No se pretende que la presente invención se limite a ningún sistema o etiqueta particular de detección.

Como se usa en este documento, el término "miARN" es una subclase de ARN monocatenario no codificante pequeño, de aproximadamente 18-23 nucleótidos de longitud que desempeña un papel importante en la regulación de procesos metabólicos, particularmente debido a su participación en la regulación de la estabilidad y la traducción de ARNm que codifica proteínas específicas. Los miARN también participan en otros procesos importantes, como la formación de heterocromatina y la reorganización del genoma.

Los términos muerte celular *in vivo* "excesiva" e "insuficiente" describen la situación cuando el número de células que mueren en un órgano o tejido particular es, respectivamente, más alto o más bajo que en controles de edad y de sexo equiparables.

Como se usa en este documento, los términos "purificado", "descontaminado" y "esterilizado" se refieren a la eliminación de un contaminante o contaminantes de una muestra.

Como se usa en este documento, los términos "sustancialmente purificado" y "sustancialmente aislado" se refieren a secuencias de ácido nucleico que se retiran de su entorno natural, aíslan o separan, y son preferiblemente 60% libres, más preferiblemente 75% libres, y lo más preferiblemente 90% libres de otros componentes con los que están asociados de forma natural. Un "polinucleótido aislado" es, por lo tanto, un polinucleótido sustancialmente purificado. Se contempla que para practicar los métodos de la presente invención, los polinucleótidos pueden ser, pero no necesitan estar sustancialmente purificados. En la técnica se conocen una variedad de métodos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos en forma no purificada.

Como se usa en el presente documento, los términos "producto de PCR" y "producto de amplificación" se refieren a la mezcla de compuestos resultante después de que se completan dos o más ciclos de las etapas de PCR de desnaturalización, hibridación y extensión. Estos términos abarcan el caso en el que ha habido amplificación de uno o más segmentos de una o más secuencias objetivo.

El término "tracto urinario" como se usa en la presente memoria se refiere a los órganos y conductos que participan en la secreción y eliminación de la orina del cuerpo.

"Paciente" o "sujeto" según se usan los términos en este documento, se refieren al receptor del tratamiento. Se incluyen pacientes mamíferos y no mamíferos. En una realización específica, el paciente es un mamífero, tal como un humano, canino, murino, felino, bovino, ovino, porcino o caprino. En una realización particular, el paciente es un humano.

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

En otra realización de la presente invención, los miARN detectados se originan y expresan específicamente en un tipo de célula específica, tejido u órgano en el cuerpo, en el que las alteraciones a nivel de dichos miARN son indicativos de patología crónica de dicho tejido, tal como, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia frontotemporal y otras enfermedades del sistema nervioso central que están causadas o acompañadas de muerte neuronal; insuficiencia cardíaca crónica asociada con la muerte de los cardiomiocitos, enfisema asociado con la muerte de las células de los pulmones; diabetes tipo 1 asociada con la muerte de células pancreáticas beta, glomerulonefritis asociada con la muerte de células renales, afecciones precancerosas asociadas con la muerte apoptótica de células precancerosas que proliferan activamente, cánceres asociados con muerte celular necrótica masiva debido a suministro sanguíneo insuficiente y muerte celular en órganos o tejidos crónicamente infectados.

En aún otra realización de la presente invención, los miARN detectados se originan y se expresan específicamente en

un tipo de célula específica, tejido u órgano en el cuerpo y se pueden usar para el pronóstico del desenlace de la enfermedad. Los cambios en los niveles de los miARN respectivos, que son indicativos de la progresión/regresión de la enfermedad, el éxito de la intervención terapéutica o quirúrgica, se usan para la monitorización de la enfermedad y el tratamiento.

5

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

10

En otra realización más de la invención, los miARN detectados se originan a partir de células de un órgano infectado y se pueden usar para el soporte de diagnóstico, la evaluación del daño tisular infectado y la monitorización adicional de la enfermedad y el tratamiento.

15

En algunas realizaciones, los niveles de miARN específicos de células y/o tejidos se normalizan usando los niveles de miARN que se encuentra en todas partes en el suero, los niveles de albúmina o creatinina en orina, o los niveles de miARN específicos de placenta para la normalización de otros miARN fetales específicos de tejido.

20

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

25

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

30

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

35

Los métodos actuales incluyen el aislamiento de los miARN de los fluidos corporales de los pacientes. En un aspecto de la divulgación, se puede detectar un miARN de interés en un fluido corporal tal como sangre, fluido amniótico, fluido cerebroespinal, plasma, leche, semen, suero, esputo, saliva y orina. En un aspecto de la presente invención, el miARN se detecta en la orina. En otra realización, el miARN se detecta en el suero.

40

El presente método de aislamiento de miARN de la presente invención puede utilizar materiales de intercambio aniónico disponibles comercialmente. Se pueden emplear intercambiadores de aniones fuertes o débiles. Al utilizar soluciones seleccionadas para adsorción y elución, el miARN puede purificarse, concentrarse y aislarse sustancialmente.

45

Empleando una solución a fuerza iónica conocida para la unión inicial del miARN a los materiales de la columna de intercambio aniónico, la mayoría de los componentes solubles en agua, incluidas otras moléculas electronegativas tales como proteínas (contaminantes débilmente unidos) pueden lavarse a través de la columna. Para la elución, la fuerza iónica requerida se alcanza usando concentraciones conocidas de una sal tal como NaCl, que se puede mezclar con un regulador para controlar el pH, que corresponde idealmente a la fuerza iónica más baja a la que los ácidos nucleicos eluirán completamente. Las sustancias contaminantes unidas a la resina de intercambio aniónico con mayor rigurosidad que los ácidos nucleicos se pueden dejar en la columna, es decir, los contaminantes unidos más fuertes se separan de los ácidos nucleicos.

50

Un intercambiador débil preferido es uno en el que los grupos amina primaria, secundaria o terciaria (es decir, aminas protonables) proporcionan sitios de intercambio. El intercambiador de aniones de base fuerte tiene grupos de amonio cuaternario (es decir, no son protonables y siempre tienen carga positiva) como sitios de intercambio. Ambos intercambiadores se seleccionan en relación con sus respectivas fuerzas de absorción y elución iónicas y/o el pH para la separación del miARN. Las fuerzas en solución son más altas que las fuerzas de unión.

55

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para aislar miARN transrenal de la orina, comprendiendo el método proporcionar orina de un sujeto; opcionalmente separar las células y residuos celulares de la orina mediante filtración o centrifugación; agregando EDTA y Tris-HCl a la orina, agregando resina de intercambio de aniones libre de sílice a la orina, incubando la mezcla, eliminando el medio de intercambio aniónico de la orina, y eluyendo el miARN de la resina.

60

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

65

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

5 En una realización adicional, el medio de intercambio aniónico es una resina basada en sefarosa con adición de grupos catiónicos de amonio cuaternario. Ejemplos de resinas basadas en sefarosa, con adición de grupos de amonio catiónico incluyen Q-Sepharose^{MR} ANX-4 Sepharose^{MR} Fast Flow, DEAE-Sepharose^{MR}, y Q-Sepharose-XL^{MR} DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare).

10 En una realización adicional, el medio de intercambio aniónico se selecciona de un medio de intercambio aniónico de amonio cuaternario con base en sefarosa, tal como filtros Q o resina Q.

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

20 En otra realización de la presente invención, el análisis periódico de las secuencias de miARN presentes, por ejemplo, en las muestras de orina de la misma persona puede proporcionar información temprana sobre un proceso patológico en un órgano o tejido particular. Por ejemplo, miARN122 se sintetiza solo en el hígado y los aumentos en su cantidad pueden ser un marcador de hepatitis u otra patología hepática. El síndrome de Alzheimer puede ir acompañado de aumentos en la concentración de miARN expresado específicamente en las neuronas.

25 En otra realización, una monitorización más detallada de los miARN específicos de tejido en la muestra de fluido corporal del paciente será útil para la estimación de la gravedad de la enfermedad y para la evaluación de la efectividad de los esfuerzos terapéuticos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

30 Ejemplos

Los ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las diversas realizaciones de la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse de ninguna manera como limitativos del alcance de la invención a la que se hace referencia en las reivindicaciones adjuntas.

35 Ejemplo 1

Extracción de miARN de la orina:

40 *Recolección de orina:* para estos experimentos, se recogieron muestras de orina de pacientes o voluntarios en un recipiente de recolección de orina estéril de 110 mL y se suplementaron inmediatamente con EDTA hasta una concentración final entre 10 y 150 mM, preferentemente 50 mM. Las muestras se almacenaron en alícuotas de 10 a 50 mL a -80°C. La filtración opcional de la orina se llevó a cabo en Stericup^{MR} (Millipore, sistema de filtración al vacío, filtro Durapore^{MR} de 0,45 µ) inmediatamente después de la recolección de la muestra antes de agregar EDTA.

45 Unión con Q: en un tubo de 50 mL, se diluyeron 20 mL de orina con un volumen igual de EDTA 50 mM (pH 8,0) y Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que luego se complementó con 1-2 mL de suspensión de Q-Sepharose^{MR} (GE Healthcare; 17-0510-10) y se mezcló rigurosamente 10 - 30 minutos a temperatura ambiente. La resina, con ácidos nucleicos unidos, se recogió mediante centrifugación a 2.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga clínica de mesa utilizando un rotor de cubeta oscilante. Todos menos ~ 500 µL de sobrenadante se eliminaron por aspiración. El sedimento de resina se resuspendió en el sobrenadante restante y se transfirió a una columna de cromatografía Micro Bio-Spin (Bio-Rad) o equivalente, que se hizo funcionar por centrifugación al vacío. La resina en la columna se lavó tres veces con 500 µL de SSC 2 veces (NaCl 300 mM/citrato de sodio 30 mM (pH 7,0)) o con regulador con una fuerza iónica comparable (por ejemplo, NaCl o LiCl 300 mM). Los ácidos nucleicos pueden eluirse a partir de Q-Sefarosa con alta fuerza iónica (por ejemplo, NaCl o LiCl 1 M) pero los métodos descritos a continuación conservan mejor el ARN.

55 Elución de Q-Sepharose^{MR} y separación de fase con TRIzol^{MR}: los ácidos nucleicos unidos se eluyeron adicionalmente con 500 µL de reactivo TRIzol^{MR} (Invitrogen). La extracción de ácidos nucleicos de TRIzol se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, para la separación de fases, el eluato de TRIzol se complementó con 100 µL de cloroformo, se mezcló vigorosamente, se incubó a temperatura ambiente durante 3 - 5 minutos y se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Evitando tocar la interfase, se transfirieron 300 µL de la fase superior a otro un tubo de centrífuga. Luego, se precipitaron los ácidos nucleicos o se limpiaron y desalinizaron adicionalmente en una columna de sílice.

65 Precipitación del ácido nucleico: para la precipitación del ácido nucleico, la preparación descrita anteriormente se complementó con 1 µL de 20 mg/mL de glucógeno (Roche) y 300 µL de alcohol isopropílico al 100%. Los ácidos nucleicos se recogieron por centrifugación, el sedimento se lavó dos veces con 200 µL de etanol al 70%, se dejó secar

al aire durante 5 min a temperatura ambiente y luego los ácidos nucleicos se disolvieron en 30 µL de EDTA 0,1 mM/1x ARN Secure (Ambion). Las muestras se incubaron a 60°C durante 10 minutos para inactivar cualquier actividad de RNasa residual.

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

15 Digestión con DNasa I y RNasa A: para verificar la identidad del ácido nucleico del material extraído de la orina con el protocolo descrito anteriormente, la presente preparación se digirió con DNasa I y/o RNasa A. La digestión con DNasa I se llevó a cabo en el regulador de reacción de DNasa I (NEB) que contiene 2 unidades de DNasa I libre de RNasa (NEB). Se realizó la digestión con RNasa A en regulador TE complementado con 50 ng/mL de RNasa A hervida. Las muestras se incubaron a 37°C durante 60 min y después de la adición de colorante de carga, las muestras se sometieron a electroforesis en poliacrilamida al 5% 1x geles TBE y se tiñeron con SYBR® Gold diluido 1/10.000 (Invitrogen). Como se muestra en la Figura 1, el material aislado representa ácidos nucleicos de bajo peso molecular, principalmente ARN y sus fragmentos. Además, (véase la Figura 1), para comparación se eluyeron los ácidos nucleicos de la resina Q con NaCl 3 M, carriles 2 y 3, y TRIzol^{MR}, carriles 4 y 5.

25 En la Figura 1, los carriles 1 y 5, representan ácidos nucleicos aislados con alto contenido de sal y elución con TRIzol de Q-Sepharose, respectivamente; los carriles 2 y 6; 3 y 7; 4 y 8, representan ácidos nucleicos después del tratamiento con DNasa, RNasa o DNasa más RNasa, respectivamente.

Además, para demostrar la existencia y el tamaño molecular del ARN, se digirieron alícuotas de ARN de ácidos nucleicos purificados con DNasa I, carriles 3 y 5.

Extracción de ARN del suero

30 Para estos experimentos, se añadieron 1,2 mL de TRIzol LS a 0,4 mL de suero, y se centrifugó la mezcla de 10 a 14.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL, se añadieron 0,3 mL de cloroformo y la mezcla se agitó durante 15 segundos. Después de la centrifugación a 14.000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo de 5 mL y se añadió etanol hasta una concentración final del 70%. La mezcla se cargó en una columna Qiagen Quick en un colector de vacío y la columna se lavó dos veces con 0,5 mL de LiCl 2 M - EtOH al 80%, una vez con 0,5 mL de etanol al 80% - acetato de sodio 80 mM (pH 5,0) y finalmente con 0,5 mL de etanol al 95%. La columna se centrifugó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL durante 3 minutos a 14.000 rpm, y el ARN se eluyó con 40 µL de H₂O.

Ejemplo 2

40 Este Ejemplo demuestra que el miARN, de las células que mueren, cruzan la barrera del riñón y pueden detectarse en la orina de un paciente.

Detección de moléculas de miARN humanas en la orina

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

Tabla 1. miARN detectado

SEQ ID NO:	ID	Secuencia	Expresión
1	hsa-miR-127	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	Sobreexpresado en el cerebro
2	hsa-miR-153	UUGCAUAGUCACAAAAGUGA	Sobreexpresado en el cerebro
3	hsa-mLR-129	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC	Específico del cerebro
4	hsa-miR-137	UAUUGC UUAAGAAUACGCGUAG	Sobreexpresado en el cerebro
5	hsa-miR-218	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	Omnipresente, sobreexpresado en el cerebro

(continuación)

SEQ ID NO:	ID	Secuencia	Expresión
6	hsa-miR-219	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU	Específico del cerebro
7	hsa-miR-128a	UCACAGUGAACCGGUCUCUUUU	Específico del cerebro
8	hsa-miR-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	Sobreexpresado en el cerebro
9	hsa-miR-138	AGCUGGUGUUGUGAAUC	Cerebro, tiroides
10	hsa-miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGGG	Cerebro y algunos otros tejidos
11	hsa-miR-124a	UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA	Específico del cerebro
12	hsa-miR-122a	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU	Específico del hígado
13	hsa-miR-133a	UUGGUCCCUUCAACCAGCUGU	Sobreexpresado en corazón y músculo
14	hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA	Sobreexpresado en corazón y músculo
15	hsa-miR-335	UCAAGAGCAAUACGAAAAAUGU	Omnipresente
16	hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	Omnipresente
17	hsa-miR-215	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC	Sobreexpresado en intestino delgado y colon
18	hsa-miR-135b	UAUGGCUUUUCAUUCUAUGUG	Sobreexpresado en la placenta
19	hsa-miR-517c	AUCGUGCAUCCUUUUAGAGUGU	Sobreexpresado en la placenta
20	hsa-miR-518e	AAAGCGCUUCCCUUCAGAGUGU	Sobreexpresado en la placenta

5 Se detectaron los tres tipos de miARN en la mayoría de las preparaciones de ARN urinario. Los números de copia más altos fueron característicos de miARN omnipresente. Sin embargo, también se pudieron detectar miARN específico de tejido o miARN sobreexpresado en un tejido o tipo de célula particular. Se ha demostrado inequívocamente que una porción de miARN de las células que mueren no se degrada, sino que aparece en el torrente sanguíneo y finalmente se excreta en la orina.

10 Ejemplo 3

El ejemplo demuestra que miARN de células de carcinoma nasofaríngeo (NPC) humano puede cruzar la barrera renal del paciente y puede detectarse en la orina del paciente mediante RT-PCR en tiempo real.

15 miARN derivado de virus en la orina

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

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

25 La transcripción inversa se realizó en 15 µL, una décima parte de la reacción de RT se sometió a amplificación por PCR usando la ADN polimerasa JumpStart de Sigma. Los siguientes cebadores se usaron a una concentración de 500 nM:

ID	Secuencia	SEQ ID NO:
BART3-3PRT	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CAC	23
	CT	
BART1-3PRT	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA GAC	24
	AT	

(continuación)

ID	Secuencia	SEQ ID NO:
BART3-3PF	CGC CGC ACC ACT AGT CAC	25
BART1-3PF	CGC TAG CAC CGC TAT CCA	26
miARNCR	GTG CAG GGT CCG AGG T	27

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

5 Como se demuestra en la Figura 2, tanto las especies de miARN, BART3 como BART1, se detectaron en la orina de
 pacientes con NPC pero no en la muestra de orina de un donante sano. Estos datos indican nuevamente que los
 miARN de células que mueren localizadas fuera del sistema urinario pueden detectarse en la orina. En la Figura 2, el
 carril 1, representa marcadores; los carriles 2 y 3, representan pacientes con carcinoma nasofaríngeo, los carriles 4 y 5,
 10 representan pacientes de control, y el carril 6, representa un control positivo, que representa los miARN sintéticos
 respectivos.

Ejemplo 4

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

Diagnóstico de accidente cerebrovascular

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

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

30 Especies de miARN: se extrajo el miARN de la orina según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Una cantidad de
 ARN equivalente a la aislada a partir de 675 µL de orina se sometió a PCR de transcripción inversa y 1/10 de la mezcla
 de RT-PCR se sometió a PCR final en tiempo real, que se llevó a cabo utilizando el protocolo proporcionado por el
 fabricante. Los datos obtenidos se normalizaron para las tasas de filtración renal individual mediante el recálculo por
 35 concentración de creatinina en la orina. Para estos experimentos, las muestras de orina recogidas de donantes sanos
 del mismo grupo de edad se utilizaron como referencia. Diferentes especies de miARN se presentan de la siguiente
 manera:

A. hsa-mir-128a

40 B. hsa-mir-9

C. hsa-mir-127

45 D. hsa-mir-137

E. hsa-mir-129

F. hsa-mir-219

50 G. hsa-mir-218

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

55 Ejemplo 5

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

Monitorización del accidente cerebrovascular

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

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

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

Los resultados resumidos en las Figuras 4A y B demuestran claramente que la dinámica de los cambios en miARNtr 129 y miARNtr 219 después del accidente cerebrovascular son diferentes en diferentes pacientes y se correlacionan con el desarrollo de la enfermedad. El aumento en la muerte neuronal una semana después del accidente cerebrovascular en el paciente No. 3 corresponde al empeoramiento en el estado clínico del paciente. Al mismo tiempo, dos pacientes, cuyo miARN transrenal específico de neuronas tenían tendencia a la normalización, demostraron una mejoría significativa.

Ejemplo 6

Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurológica progresiva que es causada por la muerte de neuronas, particularmente en la corteza y el hipocampo. El diagnóstico se basa en el examen neurológico y la exclusión de otras causas de demencia, mientras que el diagnóstico definitivo puede hacerse solo en la autopsia. La presente invención demuestra que la muerte neuronal excesiva que caracteriza la enfermedad de Alzheimer se puede monitorizar midiendo los niveles de miARN cerebrales específicos aislados de la orina del paciente.

Para estos experimentos, se investigaron pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer para el análisis de cambios en las concentraciones de miARN específicos o sobreexpresados en el cerebro como resultado de la muerte neuronal.

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

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

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

En otro conjunto de experimentos, se analizó el ARN aislado de la orina o el suero filtrados. Una cantidad de ARN equivalente a la aislada de 0,6 mL de orina o 50 µL de suero se sometió a PCR de transcripción inversa y 1/10 de la mezcla de RT-PCR se sometió a PCR final en tiempo real, que se llevó a cabo utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante (Applied Biosystems). Los datos obtenidos para el miARN de la orina se normalizaron para las tasas de filtración renal individual mediante el recálculo por concentración de creatinina en la orina. Los datos obtenidos para miARN en plasma se normalizaron por miARN-16 omnipresente. Las Figuras 6 y 7 muestran que los niveles de algunos miARN específicos de neuronas son mayores tanto en la orina filtrada como en el suero de los pacientes con Alzheimer en comparación con los controles de la misma edad.

Ejemplo 7

Enfermedad de Parkinson

5 La enfermedad de Parkinson es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central que a menudo perjudica las habilidades motoras y el habla del paciente. La presente invención demuestra que la muerte celular excesiva de las neuronas dopaminérgicas, que caracteriza la enfermedad de Parkinson, se puede controlar midiendo los niveles de miARN específicos del cerebro aislados de la orina del paciente.

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

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

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

25 Ejemplo Comparativo 8

Pruebas prenatales para enfermedades del feto o relacionadas con el embarazo

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

35 Primero, se obtiene una muestra de orina de una paciente embarazada. Cuando se desee, se aísla entonces el miARN en la muestra de orina, se purifica y/o se lo trata para evitar la degradación usando los métodos descritos anteriormente. El perfilado del miARN se realiza a continuación usando una PCR cuantitativa o una matriz de miARN y los datos obtenidos se usan para determinar diferentes patologías fetales, tal como se describe para otras patologías mencionadas anteriormente.

40 Ejemplo comparativo 9

Síndrome de Down

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar y medir la muerte celular *in vivo*, comprendiendo el método:

- 5 (a) analizar niveles de secuencias específicas de miARN en ácidos nucleicos libres de células obtenidas de una muestra de fluido corporal de un paciente, en el que la muestra de fluido corporal se selecciona de sangre, suero y orina, siendo dichas secuencias de miARN indicativas la muerte celular *in vivo* y que se originan en células que mueren en todo el cuerpo del paciente; y
(b) determinar el estado de una enfermedad o condición médica anormal en el paciente,

10 en donde dicha enfermedad o condición médica anormal es:

- (i) una infección por patógeno, preferiblemente en la que el patógeno es un virus y más preferiblemente en el que el virus es un virus de Epstein-Barr;
15 (ii) un accidente cerebrovascular;
(iii) enfermedad de Alzheimer; o
(iv) enfermedad de Parkinson.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad es un trastorno asociado con la muerte celular excesiva o insuficiente en un tejido u órgano, opcionalmente en el que la muerte celular excesiva o insuficiente está asociada con un trastorno de un tejido particular.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muerte celular *in vivo* está asociada con un trastorno de un tejido y/u órgano particular.

25 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho análisis comprende detectar dichas secuencias de miARN con un cebador y/o sonda que es sustancialmente complementario a una parte de dichas secuencias específicas de miARN.

30 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho análisis comprende una técnica seleccionada de hibridación, reacción de sonda cíclica, reacción en cadena de polimerasa, reacción en cadena de polimerasa anidada, PCR para analizar polimorfismos de conformación de cadena sencilla y reacción en cadena de ligasa.

35 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además reducir la degradación de ácido nucleico en dicha muestra de orina.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 en el que la reducción de la degradación de ácido nucleico en dicha muestra de orina comprende, adición de un inhibidor o inhibidores de ARNasa, inactivación térmica, o tratando dicha muestra de orina con un compuesto seleccionado de guanidina-HCl, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato de sodio.

8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha muestra de orina se ha mantenido en la vejiga durante menos de 12 horas.

45 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos una de las secuencias de miARN detectadas se selecciona de hsa-miR-129, hsa-miR-218, hsa-miR-219, hsa-miR-128a, hsa-miR-138, hsa-miR-134 y hsa-miR-124a.

50 10. Un método de control de la enfermedad y/o la monitorización del tratamiento en un paciente mediante análisis cuantitativo de miARN específicos libres de células en una muestra de orina, comprendiendo el método:

- (a) obtener periódicamente una muestra de orina de un paciente, siendo dichas secuencias de miARN indicativas de muerte celular *in vivo* y que se originan a partir de células que mueren en todo el cuerpo del paciente; y
(b) analizar dicha muestra para una o más secuencias específicas de miARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho análisis comprende detectar dichas una o más secuencias específicas de miARN con una sonda o sondas y/o una sonda o sondas que son sustancialmente complementarias a una parte de dichas secuencias específicas de miARN,

60 en el que dicha enfermedad y/o monitorización del tratamiento de la misma es:

- (i) una infección por patógeno, preferiblemente en la que el patógeno es un virus y más preferiblemente en el que el virus es un virus de Epstein-Barr;
(ii) un accidente cerebrovascular;
(iii) enfermedad de Alzheimer; o
65 (iv) enfermedad de Parkinson.

11. Un método para detectar y medir miARN que se origina a partir de un tipo de célula específica, tejido u órgano en el cuerpo de un paciente, comprendiendo el método:

5 (a) analizar los niveles de secuencias específicas de miARN en ácidos nucleicos libres de células obtenidas de una muestra de fluido corporal de un paciente, en el que la muestra de fluido corporal se selecciona de sangre, suero y orina, dichas secuencias de miARN se originan en un tipo de célula específico, tejido u órgano en el paciente; y (b) detectar alteraciones en el nivel de secuencias específicas de miARN que son indicativas de una patología crónica, o el efecto citotóxico de agentes físicos o químicos,

10 en donde la patología crónica se selecciona de demencia frontotemporal, insuficiencia cardíaca crónica asociada con la muerte de cardiomiocitos, enfisema asociado con la muerte de células pulmonares, diabetes tipo 1 asociada con la muerte de células pancreáticas beta, glomerulonefritis asociada con la muerte de células renales y muerte celular en órganos o tejidos infectados de forma crónica.

15 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el efecto citotóxico de los agentes físicos o químicos se selecciona de la radiación asociada con dosis que matan células de médula ósea, dosis que conducen a la muerte de células epiteliales del sistema gastrointestinal y dosis que matan neuronas cerebrales, y citotoxicidad química asociada con la muerte celular en diferentes órganos y tejidos inducidos por compuestos tóxicos naturales o sintéticos.

Figura 1

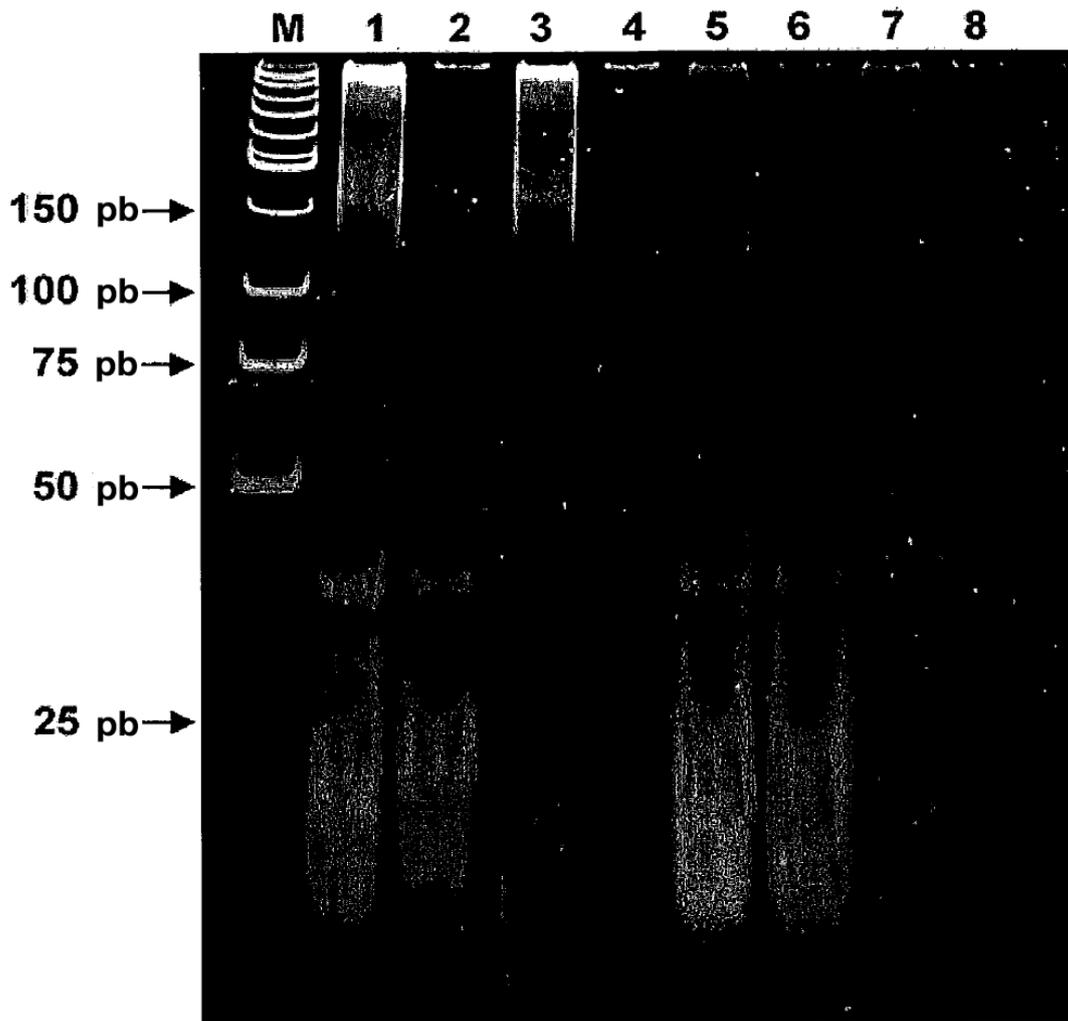
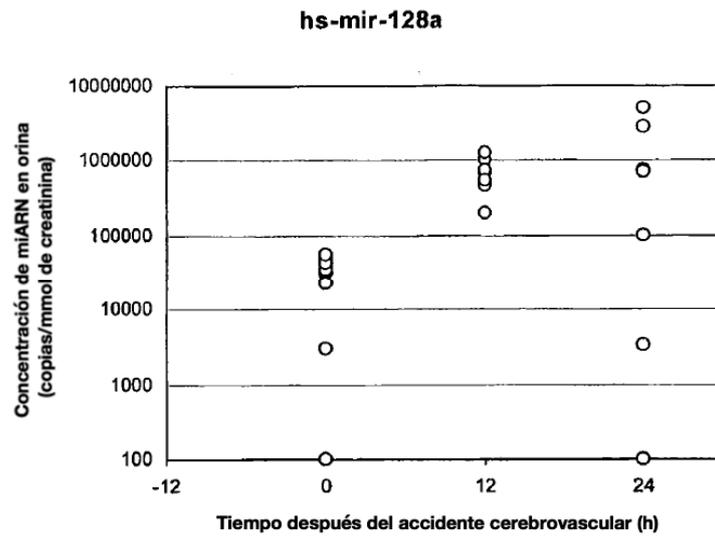


Figura 2

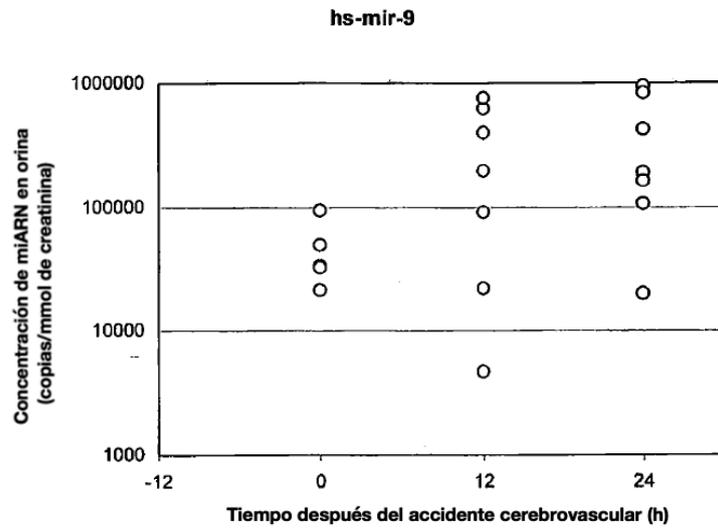


Figura 3

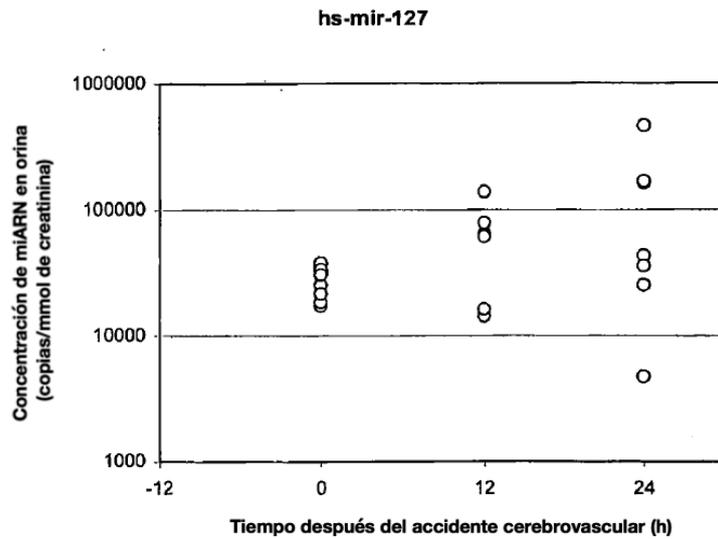
A



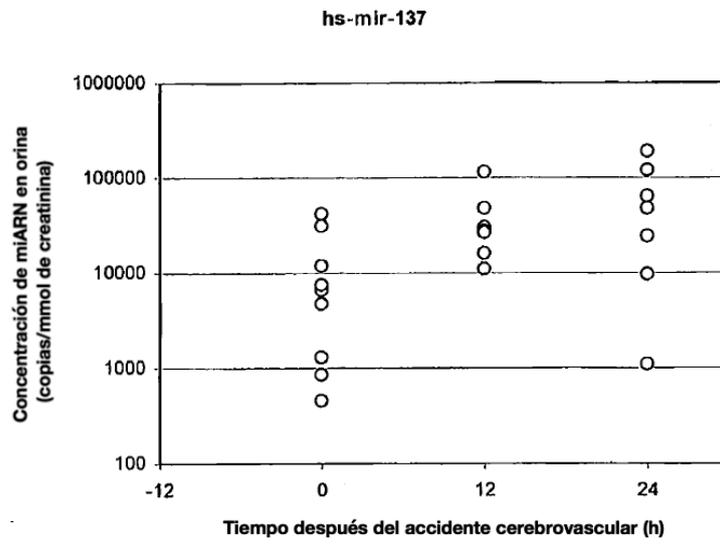
B



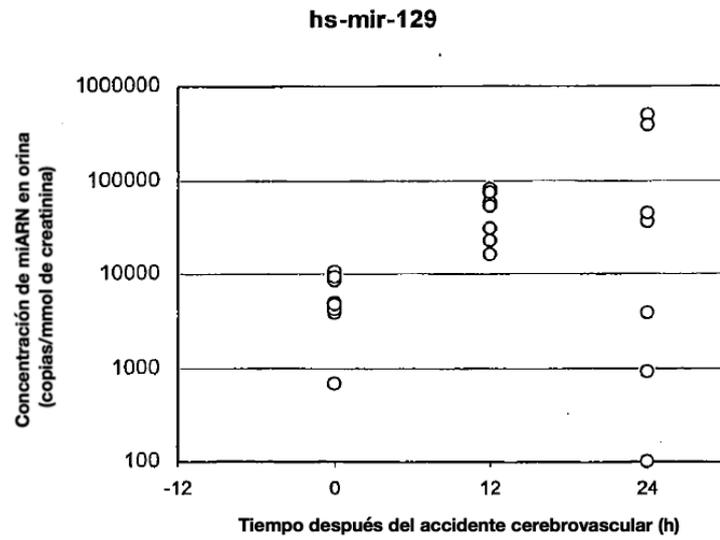
C



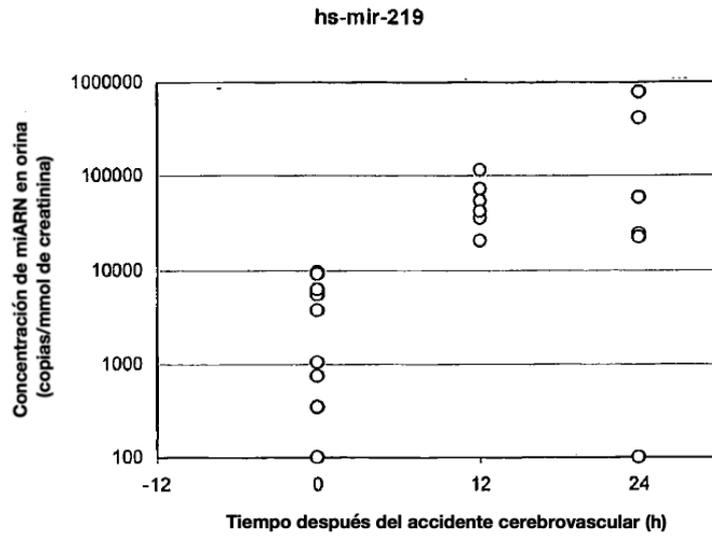
D



E



F



G

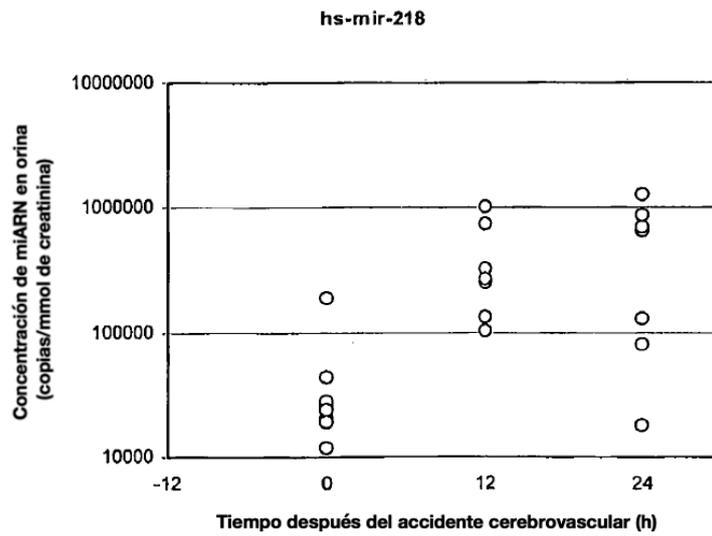


Figura 4

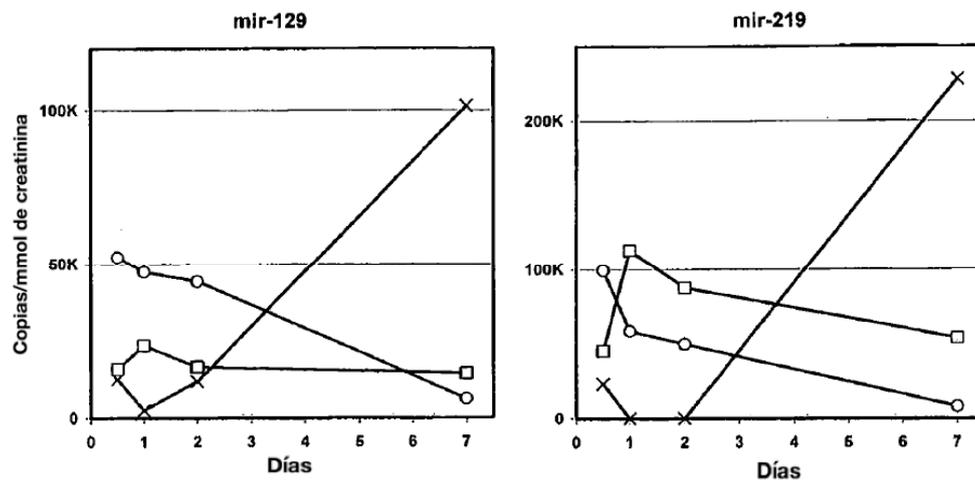
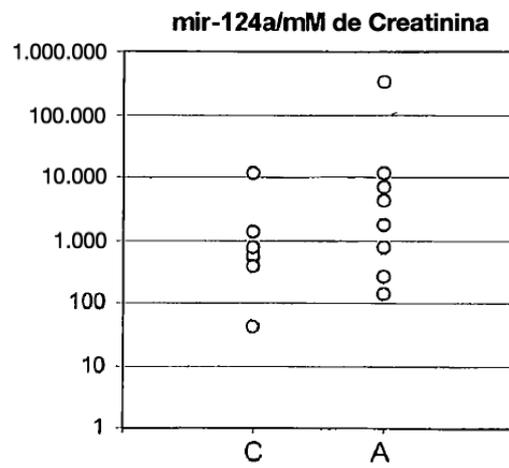
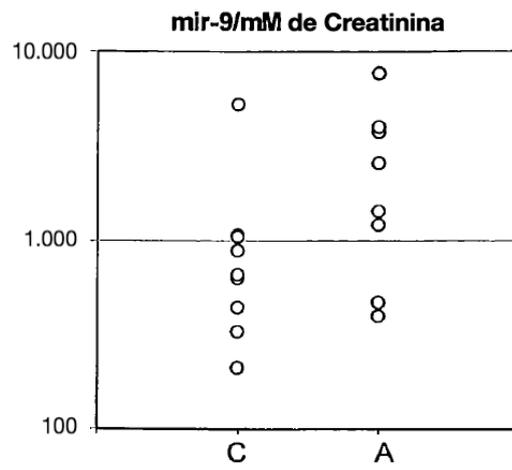
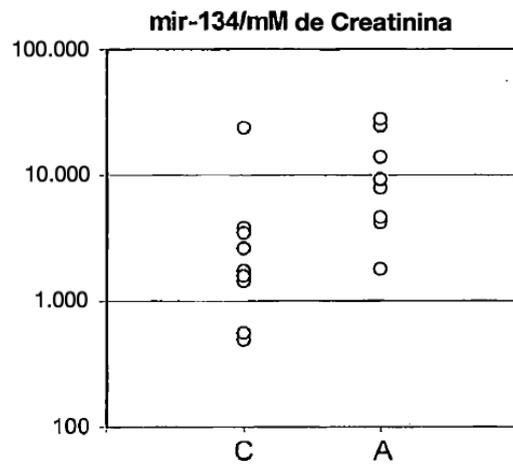
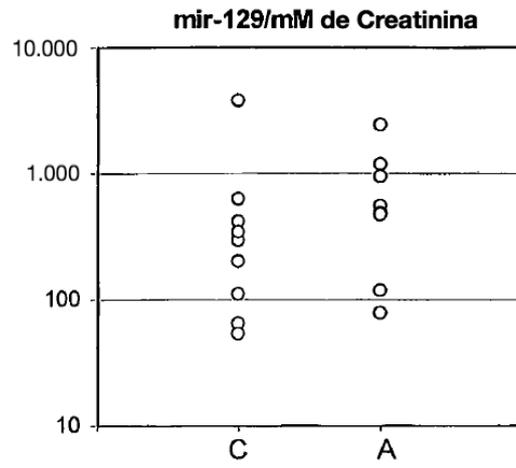


Figura 5





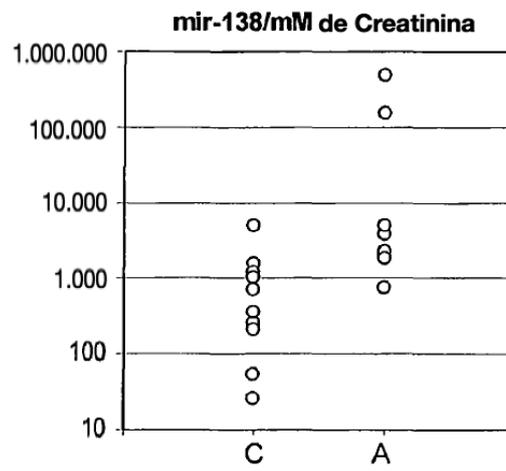
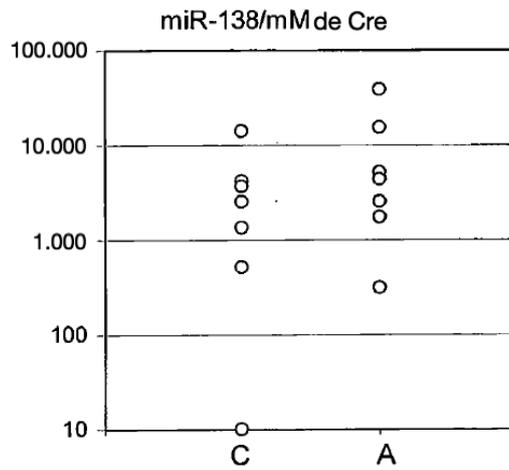
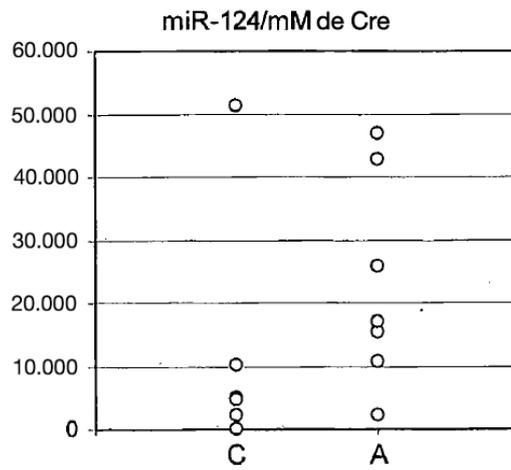


Figura 6



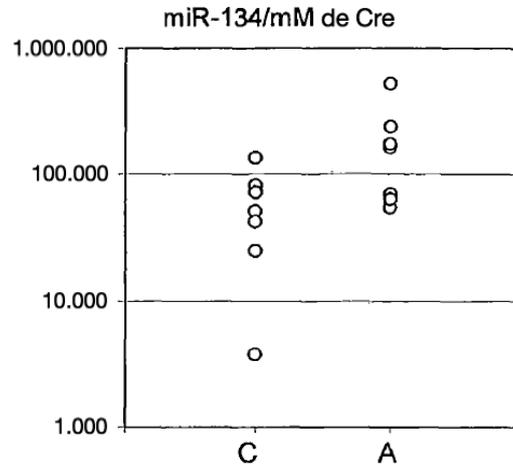
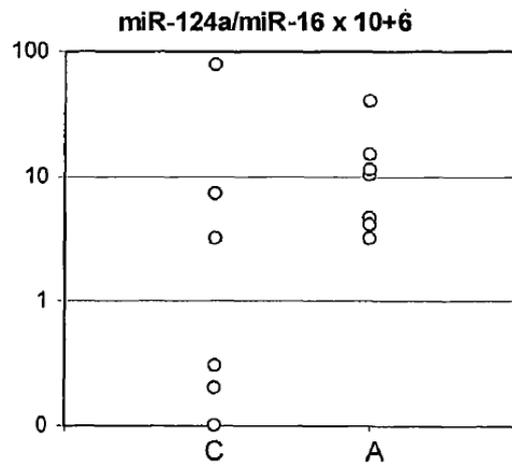


Figura 7



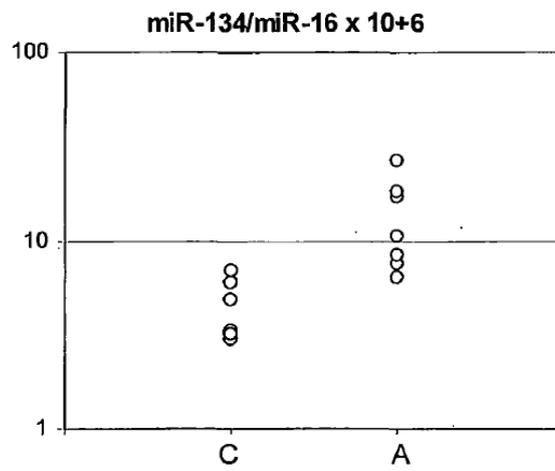
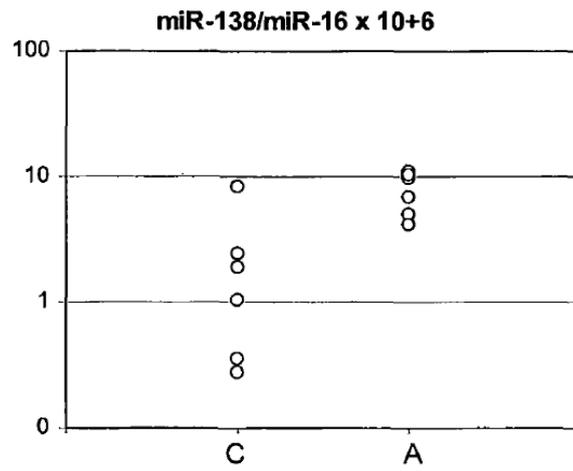
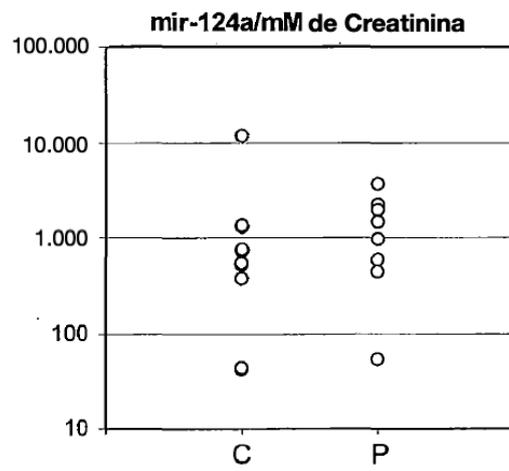
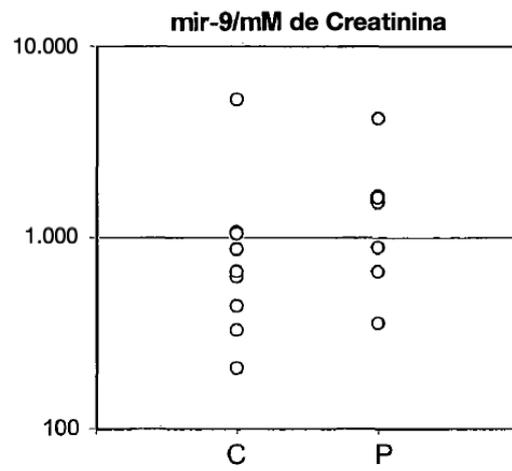


Figura 8



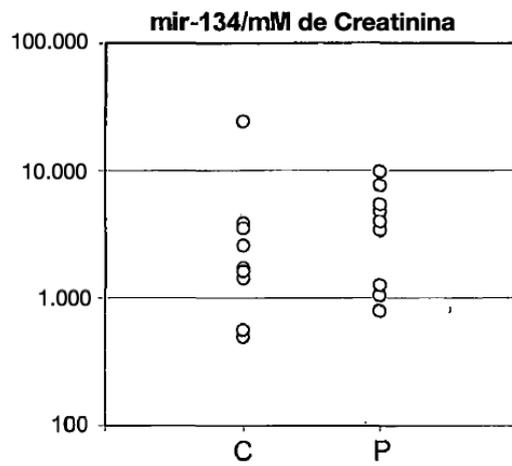
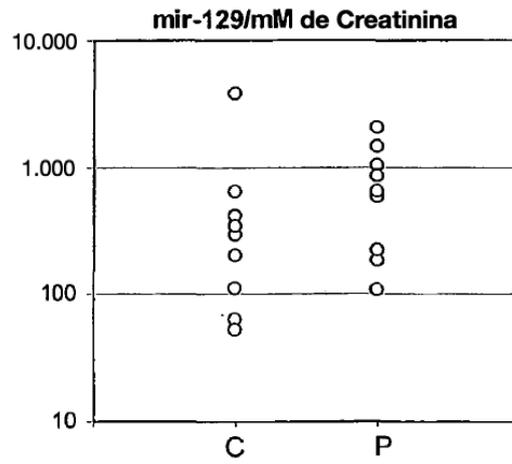


Figura 9

