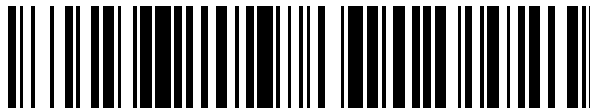


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 631**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2014 PCT/EP2014/079499**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2015 WO15101653**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2014 E 14827245 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 3090059**

54 Título: **Determinaciones de cáncer de pulmón utilizando relaciones de miARN**

30 Prioridad:

05.01.2014 US 201461923758 P
12.01.2014 US 201461926323 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.10.2018

73 Titular/es:

BIOMIRNA HOLDINGS LTD. (100.0%)
24 Farney Park Sandymount
Dublin 4, IE

72 Inventor/es:

SOZZI, GABRIELLA;
BOERI, MATTIA y
PASTORINO, UGO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 686 631 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

Determinaciones de cáncer de pulmón utilizando relaciones de miARN

5 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere en general al diagnóstico y determinación del riesgo de cáncer de pulmón. Más específicamente, la aplicación se dirige al uso de relaciones de expresión de miARN para determinar un riesgo de manifestar un tumor pulmonar o un tumor pulmonar agresivo, y para determinar la presencia de un tumor pulmonar o un tumor pulmonar agresivo.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo (Jemal et al., CA Cancer J Clin, 61: 69-9, 2011). Actualmente, la mayoría de los cánceres de pulmón se detectan en una etapa avanzada donde los tratamientos tienen una eficacia limitada y las tasas de supervivencia son bajas. La detección del cáncer de pulmón en una etapa temprana puede reducir significativamente la mortalidad.

20 Los ensayos aleatorizados de detección de cáncer de pulmón en Europa, con un brazo de control observacional pero tamaño limitado, no han demostrado reducciones de mortalidad hasta la fecha (Infante et al., Am J Respir Crit Care Med 180: 445-453, 2009; Saghir et al., Thorax 67: 296-301, 2012; Pastorino et al., Eur J Cancer Prev. 21: 308-315, 2012); sin embargo, los resultados del gran Ensayo Nacional de Detección de Pulmón patrocinado por el NCI (NSLT) mostraron una reducción del 20% en la mortalidad con tomografía computarizada de baja dosis (LDCT) de individuos de alto riesgo con antecedentes de ≥ 30 paquetes año y ≤ 15 años desde que dejaron de fumar, en comparación con la radiografía de tórax anual (Aberle et al., N Engl J Med 365: 395-409, 2011). Las altas tasas de falsos positivos, el coste de evaluar el gran número de personas con alto riesgo (en EE. UU. estimado en USD\$ 3.5 millones) y los daños potenciales asociados con la detección de LDCT siguen siendo consideraciones en entornos clínicos (Aberle et al., 2011; Goulart et al. J Natl Compr Canc Netw 10: 267-275, 2012).

30 Por lo tanto, existe una necesidad de metodologías adicionales para mejorar la predicción, el pronóstico y el diagnóstico del cáncer de pulmón. La presente invención aborda esa necesidad.

Resumen de la invención

35 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que los métodos de ensayo pueden utilizar biomarcadores de miARN circulantes para proporcionar un clasificador de tres niveles para un ensayo global de "riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar".

40 Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un método para determinar la presencia de un tumor pulmonar en un sujeto. El método comprende:

(a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

45 (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

(c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

50 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos nueve relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 27 pares de miARN a menos de nueve relaciones de expresión de pares de miARN se les asigna una puntuación positiva,

55 en la que los pares de miARN comprenden 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b, o 320/660, o las relaciones inversas de los mismos;

y

60 (e) categorizar la presencia de un tumor pulmonar como (i) positiva si al menos nueve de las relaciones de expresión del par de miARN tienen asignada una puntuación positiva, o (ii) negativa si se asignan puntuaciones positivas a menos de nueve relaciones de expresión de pares de miARN.

65 De acuerdo con otra realización, un método para determinar la presencia de un tumor pulmonar agresivo en un sujeto comprende:

(a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

5 (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

10 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

(d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 28 pares de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN,

15 donde los pares de miARN comprenden 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p, o 320/660, o las relaciones inversas de los mismos; y

20 (e) categorizar la presencia de un tumor pulmonar agresivo como (i) positivo si al menos catorce de las relaciones de expresión del par de miARN se les asigna una puntuación positiva, o (ii) negativo si se les asigna una puntuación de positivo a menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN.

De acuerdo con otra realización más, un método para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar en un sujeto comprende:

25 (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

(b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

30 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

35 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos diez relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 27 de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de diez relaciones de expresión de pares de miARN,

40 donde los pares de miARN comprenden 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197 o 28-3p/451, o las relaciones inversas de los mismos; y

(e) categorizar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar como (i) positivo si al menos diez relaciones de expresión de pares de miARN tienen una puntuación positiva, o (ii) negativa si se asignan puntuaciones positivas a menos de diez relaciones de expresión de miARN.

45 De acuerdo con otras realizaciones, un método para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo comprende:

(a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

50 (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

55 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

60 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 28 pares de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN,

donde los pares de miARN comprenden 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660, o 28-3p/660, o las razones inversas de los mismos; y

65 (e) categorizar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo como (i) positivo si al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tienen una puntuación positiva, o (ii) negativo si se asignan puntuaciones positivas a menos de catorce relaciones de expresión del par de miARN.

En otras realizaciones, un método para predecir el riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar en un sujeto comprende:

- 5 (a) determinar la presencia de una firma de tumor pulmonar descrita anteriormente;
- (b) determinar la presencia de una firma agresiva de tumor pulmonar descrita anteriormente;
- 10 (c) determinar el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar descrita anteriormente;
- (d) determinar el riesgo de manifestar una firma agresiva de tumor pulmonar descrita anteriormente;
- 15 (e) categorizar al sujeto como de bajo riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar si ninguna de las firmas de las etapas (a) - (d) se categoriza como positiva;
- (f) categorizar al sujeto como que tiene un riesgo intermedio de desarrollar o tener un tumor pulmonar si al menos la presencia de una firma de tumor pulmonar de la etapa (a) es positiva, o el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar de la etapa (c) es positivo; y tanto la presencia de una firma de tumor pulmonar agresivo de la etapa (b) como el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar agresivo de la etapa (d) son negativos; y
- 20 (g) categorizar al sujeto como alto riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar si al menos la presencia de una firma tumoral pulmonar agresiva de la etapa (b) es positiva o si el riesgo de manifestar una firma tumoral pulmonar agresiva de la etapa (d) es positivo.

25 Se proporciona adicionalmente un método para establecer opciones de tratamiento para un sujeto. El método comprende probar al sujeto usando cualquiera de los métodos anteriores y determinar las opciones de tratamiento de acuerdo con los resultados del método. El método puede comprender además administrar un tratamiento al sujeto que necesita dicho tratamiento.

30 Aunque la divulgación se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la divulgación, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 es un diagrama que describe las características de la muestra consorte en el ejemplo 1, el estudio de Detección de Pulmón Italiano Multicéntrico (MILD), 2005-2012.

40 La figura 2 es un gráfico y una tabla que muestran la supervivencia a tres años desde la fecha de recogida de la muestra de sangre de acuerdo con el clasificador de firma de miARN (MSC) entre todos los sujetos.

Descripción detallada de la invención

45 De acuerdo con una realización, la presente invención utiliza múltiples relaciones de niveles de expresión de miARN para determinar (a) el riesgo de manifestar un tumor pulmonar, (b) el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo, (c) la presencia de un tumor pulmonar, (d) la presencia de un tumor agresivo y, al combinar el riesgo detectado en las etapas (a)-(d), determinar el riesgo general de tener o desarrollar un tumor pulmonar.

50 La presente invención puede incluir la eliminación de muestras que tienen niveles detectables de hemólisis, por ejemplo, incluyendo el uso de un clasificador de hemólisis de miARN; uso de un clasificador de tres niveles (bajo, intermedio o alto) de "riesgo de enfermedad" en lugar de un clasificador de dos niveles (bajo, alto); o el uso de muestras de plasma de control de sujetos individuales, en lugar de grupos.

55 Se pueden incluir tres miARN, miR-101, miR-145 y miR-133a, que se excluyeron en la etapa de validación de ensayos previos debido a la alta variabilidad en los grupos de control.

60 De acuerdo con un método de ejemplo de la presente invención, el "clasificador de firmas de microARN" (MSC) proporciona una sensibilidad de detección del 87% para MSC solo y del 98% cuando se combina con una exploración de tomografía computarizada de baja dosis (LDCT). MSC puede utilizarse por separado o en combinación con otros métodos, como LDCT, en un enfoque sinérgico para mejorar la eficacia de LDCT para la detección del cáncer de pulmón evitando nuevas rondas de LDCT en una gran proporción de sujetos y un seguimiento diagnóstico invasivo innecesario. El rendimiento pronóstico y diagnóstico de MSC solo, como se detalla en esta solicitud, demuestra que, independientemente de la etapa del tumor, los miARN medidos dentro del MSC no son simplemente un resultado de carga tumoral sino más bien indicadores de patogénesis relacionados con la agresividad tumoral.

65

5 El desarrollo de MSC se basó en un enfoque computacional no sesgado para la detección de 4.950 relaciones de 100 miARN plasmáticos diferentes para la selección del conjunto óptimo de relaciones de miARN para la detección del cáncer de pulmón y la asociación con un mal pronóstico (Boeri et al., Proc Natl Acad Sci USA 108: 3713-3718, 2011). Estas relaciones de miARN pueden reflejar la regulación entre mecanismos de regulación de miARN en diferentes componentes celulares del tumor y el microambiente circundante. Sin estar sujetos a ninguna teoría en particular, las células del estroma pueden ser activadas por el microambiente inflamado del pulmón, liberando miARN específicos en la circulación que podrían estar involucrados funcionalmente en la regulación de genes diana asociados con la transformación neoplásica.

10 El MSC utiliza un ensayo robusto de firmas de miARN derivadas de plasma. El MSC tiene un rendimiento de diagnóstico para la presencia de enfermedad maligna, el riesgo de malignidad futura y la capacidad de distinguir los cánceres de pulmón de la gran mayoría de los ganglios pulmonares LDCT detectados benignos. Las firmas particulares que pueden ser utilizadas por el MSC se detallan en este documento.

15 Firma "Presencia de Tumor Pulmonar"

En algunas realizaciones, se proporciona un método para determinar la presencia de un tumor pulmonar en un sujeto. El método comprende:

20 (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

(b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

25 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

30 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos nueve relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 27 pares de miARN a menos de nueve relaciones de expresión de pares de miARN se les asigna una puntuación positiva,

35 en la que los pares de miARN comprenden 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b, o 320/660, o las relaciones inversas de los mismos; y

(e) categorizar la presencia de un tumor pulmonar como (i) positiva si al menos nueve de las relaciones de expresión del par de miARN tienen asignada una puntuación positiva, o (ii) negativa si se asignan puntuaciones positivas a menos de nueve relaciones de expresión de pares de miARN.

40 En algunas realizaciones, los pares de miARN de este ensayo comprenden más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6, más de 7, más de 8, más de 9, más de 10, más de 11, más de 12, o cada una de las proporciones 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b y 320/660, o las relaciones inversas de los mismos.

45 En otras realizaciones, los pares de miARN pueden comprender además las relaciones 106a/660, 106a/92a, 126/660, 140-5p/197, 140-5p/28-3p, 142-3p/145, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 17/660, 17/92a, 197/660, 197/92a, 19b/660, o 28-3p/660, o sus relaciones inversas.

50 En aún otras realizaciones, los pares de miARN comprenden al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, o cada una de las proporciones 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b, 320/660, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 140-5p/197, 140-5p/28-3p, 142-3p/145, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 17/660, 17/92a, 197/660, 197/92a, 19b/660 y 28-3p/660, o las relaciones inversas de los mismos. El experto en la materia entendería que se esperaría que la utilización de algunas de estas 27 relaciones, pero no todas, proporcionase un ensayo que identificara con precisión la presencia de un tumor.

60 En algunas realizaciones, la invención proporciona el uso de una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de 27 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico útil para determinar la presencia de un tumor pulmonar en un sujeto, en el que la detección comprende:

(a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

65 (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

(c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

5 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos nueve relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 27 pares de miARN a menos de nueve relaciones de expresión de pares de miARN se les asigna una puntuación positiva,

10 en la que los pares de miARN comprenden 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b, o 320/660, o las relaciones inversas de los mismos; y

15 (e) categorizar la presencia de un tumor pulmonar como (i) positiva si al menos nueve de las relaciones de expresión del par de miARN se les asigna una puntuación positiva, o (ii) negativo si a menos de nueve relaciones de expresión de par de miARN se les asigna una puntuación positiva.

20 En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6, más de 7, más de 8, más de 9, más de 10, más de 11, más de 12, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b y 320/660, o las relaciones inversas en esto.

25 En otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles adicionalmente para detectar las relaciones de expresión del par de miARN 106a/660, 106a/92a, 126/660, 140-5p/197, 140-5p/28-3p, 142-3p/145, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 17/660, 17/92a, 197/660, 197/92a, 19b/660 o 28-3p/660, o las relaciones inversas en esto.

30 En otras realizaciones más, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b, 320/660, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 140-5p/197, 140-5p/28-3p, 142-3p/145, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 17/660, 17/92a, 197/660, 197/92a, 19b/660 y 28-3p/660, o el inverso relaciones de los mismos. El experto en la materia entendería que se esperaría que la utilización de algunas de estas 27 relaciones, pero no todas, proporcionase un ensayo que identificara con precisión la presencia de un tumor.

35 En algunas realizaciones, al menos un cebador o sonda en la pluralidad de cebadores y sondas es capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de un par de miARN en una muestra. En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas comprende al menos un cebador o sonda capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b, 320/660, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 140-5p/197, 140-5p/28-3p, 142-3p/145, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 17/660, 17/92a, 197/660, 197/92a, 19b/660, y 28-3p/660 en una muestra.

45 En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit para determinar la presencia de un tumor pulmonar en un sujeto. El kit comprende una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de los 27 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico y las instrucciones para determinar la presencia de un tumor pulmonar en un sujeto que utiliza la pluralidad de cebadores o sondas. Las instrucciones comprenden:

50 (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

(b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

55 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

60 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos nueve relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 27 pares de miARN a menos de nueve relaciones de expresión de pares de miARN se les asigna una puntuación positiva,

65 en la que los pares de miARN comprenden 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b, o 320/660, o las relaciones inversas de los mismos;

y

(e) categorizar la presencia de un tumor pulmonar como (i) positiva si al menos nueve de las relaciones de expresión del par de miARN tienen asignada una puntuación positiva, o (ii) negativa si se asignan puntuaciones positivas a menos de nueve relaciones de expresión de pares de miARN.

En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas provistos en el kit son útiles para detectar más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6, más de 7, más de 8, más de 9, más de 10, más de 11, más de 12, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b y 320/660, o las razones inversas de los mismos.

En otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas provistos en el kit son útiles adicionalmente para detectar las relaciones de expresión del par de miARN 106a/660, 106a/92a, 126/660, 140-5p/197, 140-5p/28-3p, 142-3p/145, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 17/660, 17/92a, 197/660, 197/92a, 19b/660 o 28-3p/660, o las razones inversas de los mismos.

En aún otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas provistos en el kit son útiles para detectar al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, o cada uno de los pares de miARN ratios de expresión 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b, 320/660, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 140-5p/197, 140-5p/28-3p, 142-3p/145, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 17/660, 17/92a, 197/660, 197/92a, 19b/660 y 28-3p/660, o las razones inversas de los mismos.

En algunas realizaciones, al menos un cebador o sonda en la pluralidad de cebadores y sondas proporcionados en el kit es capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de un par de miARN en una muestra. En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas provistos en el kit comprende al menos un cebador o sonda capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, a al menos 26, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b, 320/660, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 140-5p/197, 140-5p/28-3p, 142-3p/145, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 17/660, 17/92a, 197/660, 197/92a, 19b/660 y 28-3p/660 en una muestra.

Firma de "presencia de tumor pulmonar agresivo"

En otras realizaciones, se proporciona un método para determinar la presencia de un tumor pulmonar agresivo en un sujeto. El método comprende:

(a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

(b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

(c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

(d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 28 pares de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN,

donde los pares de miARN comprenden 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p, o 320/660, o las relaciones inversas de los mismos; y

(e) categorizar la presencia de un tumor pulmonar agresivo como (i) positivo si al menos catorce de las relaciones de expresión del par de miARN se les asigna una puntuación positiva, o (ii) negativa si se les asigna una puntuación de expresión positivo a menos de catorce pares de miARN.

En algunas realizaciones, los pares de miARN de este ensayo comprenden más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6, más de 7, más de 8, más de 9, o cada uno de los relaciones 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p y 320/660, o las relaciones inversas de las mismas.

En otras realizaciones, los pares de miARN pueden comprender además las proporciones 106a/451, 106a/486-5p, 126/451, 126/486-5p, 126/660, 140-5p/197, 16/197, 17/451, 17/486-5p, 197/451, 197/486-5p, 197/660, 197/92a, 19b/451, 19b/486-5p, 19b/660, 28-3p/451, o 28-3p/486-5p, o las relaciones inversas de los mismos.

- En aún otras realizaciones, los pares de miARN comprenden al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27 o cada una de las proporciones 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p, 320/660, 106a/451, 106a/486-5p, 126/451, 126/486-5p, 126/660, 140-5p/197, 16/197, 17/451, 17/486-5p, 197/451, 197/486-5p, 197/660, 197/92a, 19b/451, 19b/486-5p, 19b/660, 28-3p/451, o 28-3p/486-5p, o las relaciones inversas de los mismos. El experto en la materia entendería que se esperaría que la utilización de algunas de estas 28 relaciones, pero no de todas, proporcionara un ensayo que identificara con precisión la presencia de un tumor agresivo.
- En otras realizaciones, la invención proporciona el uso de una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de 28 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico útil para determinar la presencia de un tumor pulmonar agresivo en un sujeto, en el que la detección comprende:
- determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;
 - comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;
 - asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);
 - repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 28 pares de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN, donde los pares de miARN comprenden 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p, o 320/660, o las relaciones inversas de los mismos; y
 - categorizar la presencia de un tumor pulmonar agresivo como (i) positivo si al menos catorce de las relaciones de expresión del par de miARN se les asigna una puntuación positiva, o (ii) negativo si se les asigna una puntuación de expresión positiva a menos de catorce pares de miARN.
- En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6, más de 7, más de 8, más de 9 o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p y 320/660, o las razones inversas de los mismos.
- En otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles adicionalmente para detectar las relaciones de expresión del par de miARN 106a/451, 106a/486-5p, 126/451, 126/486-5p, 126/660, 140-5p/197, 16/197, 17/451, 17/486-5p, 197/451, 197/486-5p, 197/660, 197/92a, 19b/451, 19b/486-5p, 19b/660, 28-3p/451, o 28-3p/486-5p, o las relaciones inversas de los mismos.
- En aún otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27 o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p, 320/660, 106a/451, 106a/486-5p, 126/451, 126/486-5p, 126/660, 140-5p/197, 16/197, 17/451, 17/486-5p, 197/451, 197/486-5p, 197/660, 197/92a, 19b/451, 19b/486-5p, 19b/660, 28-3p/451, o 28-3p/486-5p, o las relaciones inversas de los mismos. El experto en la materia entendería que se esperaría que la utilización de algunas de estas 28 relaciones, pero no de todas, proporcionara un ensayo que identificara con precisión la presencia de un tumor agresivo.
- En algunas realizaciones, al menos un cebador o sonda en la pluralidad de cebadores y sondas es capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de un par de miARN en una muestra. En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas comprende al menos un cebador o sonda capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27 o cada una de las proporciones de expresión del par de miARN 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p, 320/660, 106a/451, 106a/486-5p, 126/451, 126/486-5p, 126/660, 140-5p/197, 16/197, 17/451, 17/486-5p, 197/451, 197/486-5p, 197/660, 197/92a, 19b/451, 19b/486-5p, 19b/660, 28-3p/451 o 28-3p/486-5p en una muestra.
- En otras realizaciones, la invención proporciona un kit para determinar la presencia de un tumor pulmonar agresivo en un sujeto. El kit comprende una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de 28 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico e instrucciones para determinar la presencia de un tumor pulmonar agresivo en un sujeto que utiliza la pluralidad de cebadores o sondas. Las instrucciones comprenden:
- determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

(b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

5 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

10 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 28 pares de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN,

15 en la que los pares de miARN comprenden 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p, o 320/660, o las relaciones inversas de los mismos; y

(e) categorizar la presencia de un tumor pulmonar agresivo como (i) positivo si al menos catorce de las relaciones de expresión del par de miARN se les asigna una puntuación positiva, o (ii) negativo si se les asigna una puntuación de expresión positiva a menos de catorce pares de miARN.

20 En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6, más de 7, más de 8, más de 9 o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p y 320/660, o las razones inversas de los mismos.

25 En otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son además útiles para detectar las relaciones de expresión del par de miARN 106a/451, 106a/486-5p, 126/451, 126/486-5p, 126/660, 140-5p/197, 16/197, 17/451, 17/486-5p, 197/451, 197/486-5p, 197/660, 197/92a, 19b/451, 19b/486-5p, 19b/660, 28-3p/451, o 28-3p/486-5p, o las relaciones inversas de los mismos.

30 En otras realizaciones más, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27 o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p, 320/660, 106a/451, 106a/486-5p, 126/451, 126/486-5p, 126/660, 140-5p/197, 16/197, 17/451, 17/486-5p, 197/451, 197/486-5p, 197/660, 197/92a, 19b/451, 19b/486-5p, 19b/660, 28-3p/451, o 28-3p/486-5p, o las relaciones inversas de los mismos.

35 En algunas realizaciones, al menos un cebador o sonda en la pluralidad de cebadores y sondas proporcionados en el kit es capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de un par de miARN en una muestra. En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas provistos en el kit comprende al menos un cebador o sonda capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p, 320/660, 106a/451, 106a/486-5p, 126/451, 126/486-5p, 126/660, 140-5p/197, 16/197, 17/451, 17/486-5p, 197/451, 197/486-5p, 197/660, 197/92a, 19b/451, 19b/486-5p, 19b/660, 28-3p/451 o 28-3p/486-5p en una muestra.

45 Junto con las dos firmas de diagnóstico (“presencia de tumor pulmonar” y “presencia de tumor pulmonar agresivo”) descritas anteriormente, se proporcionan dos firmas de pronóstico: una firma de “riesgo de manifestar un tumor pulmonar” y un “riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar agresivo. Estas firmas de pronóstico pueden utilizarse para determinar el riesgo dentro de un período de tiempo después de la toma de la muestra, por ejemplo, 3 meses, 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses o cualquier momento fuera o entre esos períodos.

50 Firma “Riesgo de manifestar un tumor pulmonar”

Por lo tanto, en realizaciones adicionales, se proporciona un método para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar en un sujeto. El método comprende:

55 (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

(b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

60 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

(d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos diez relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 27 de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de diez relaciones de expresión de pares de miARN,

5 donde los pares de miARN comprenden 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197 o 28-3p/451, o las relaciones inversas de los mismos; y

10 (e) categorizar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar como (i) positivo si al menos diez relaciones de expresión de pares de miARN tienen una puntuación positiva, o (ii) negativo si se asignan puntuaciones positivas a menos de diez relaciones de expresión de miARN.

En algunas realizaciones, los pares de miARN de este ensayo comprenden más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, o cada una de las proporciones 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197 y 28-3p/451, o sus relaciones inversas.

15 En otras realizaciones, los pares de miARN pueden comprender además las relaciones 101/140-3p, 106a/451, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 133a/451, 133a/660, 140-3p/660., 142-3p/15b, 15b/451, 15b/660, 17/451, 17/660, 17/92 a, 197/19b, 197/451, 197/660, 197/92a, 19b/660, 28-3p/660, o 320/660, o sus relaciones inversas.

20 En aún otras realizaciones, los pares de miARN comprenden al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, o cada una de las proporciones 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197, 28-3p/451, 101/140-3p, 106a/451, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 133a/451, 133a/660, 140-3p/660, 142-3p/15b, 15b/451, 15b/660, 17/451, 17/660, 17/92a, 197/19b, 197/451, 197/660, 197/92a, 19b/660, 28-3p/660, o 320/660, o sus relaciones inversas. El experto en la materia entendería que se esperaría que la utilización de algunas de estas 27 relaciones, pero no todas, proporcionara un ensayo que identificara con precisión el riesgo de manifestar un tumor pulmonar.

25 En algunas realizaciones, la invención proporciona el uso de una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de los 27 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico o pronóstico útil para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar en un sujeto, donde la detección comprende:

(a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

35 (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

(c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

40 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos diez relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 27 de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de diez relaciones de expresión de pares de miARN,

45 en donde los pares de miARN comprenden 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197 o 28-3p/451, o las relaciones inversas de los mismos; y

50 (e) categorizar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar como (i) positivo si al menos diez relaciones de expresión de pares de miARN tienen una puntuación positiva, o (ii) negativo si se asignan puntuaciones positivas a menos de diez relaciones de expresión de miARN.

En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197 y 28-3p/451, o las razones inversas de los mismos.

55 En otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles adicionalmente para detectar las relaciones de expresión del par de miARN 101/140-3p, 106a/451, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 133a/451, 133a/660, 140-3p/660, 142-3p/15b, 15b/451, 15b/660, 17/451, 17/660, 17/92a, 197/19b, 197/451, 197/660, 197/92a, 19b/660, 28-3p/660, o 320/660, o las razones inversas de los mismos.

60 En aún otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197, 28-3p/451, 101/140-3p, 106a/451, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 133a/451, 133a/660, 140-3p/660, 142-3p/15b, 15b/451, 15b/660, 17/451, 17/660, 17/92a, 197/19b, 197/451, 197/660, 197/92a, 19b/660, 28-3p/660, o 320/660, o las relaciones inversas de los mismos. El experto en la materia

entendería que se esperaría que la utilización de algunas de estas 27 relaciones, pero no todas, proporcionara un ensayo que identificara con precisión el riesgo de manifestar un tumor pulmonar.

5 En algunas realizaciones, al menos un cebador o sonda en la pluralidad de cebadores y sondas es capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de un par de miARN en una muestra. En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas comprende al menos un cebador o sonda capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26 o cada uno de los miARN relaciones de expresión de pares 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197, 28-3p/451, 101/140-3p, 106a/451, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 133a/451, 133a/660, 140-3p/660, 142-3p/15b, 15b/451, 15b/660, 17/451, 17/660, 17/92a, 197/19b, 197/451, 197/660, 197/92a, 19b/660, 28-3p/660 o 320/660 en una muestra.

15 En otras realizaciones, la invención proporciona un kit para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar en un sujeto. El kit comprende una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de 27 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico o pronóstico e instrucciones para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar en un sujeto que utiliza la pluralidad de cebadores o sondas. Las instrucciones comprenden:

- (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;
- 20 (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;
- (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);
- 25 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos diez relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 27 de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de diez relaciones de expresión de pares de miARN,
- 30 en donde los pares de miARN comprenden 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197 o 28-3p/451, o las relaciones inversas de los mismos; y
- (e) categorizar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar como (i) positivo si al menos diez relaciones de expresión de pares de miARN tienen una puntuación positiva, o (ii) negativo si se asignan puntuaciones positivas a menos de diez relaciones de expresión de miARN.
- 35

40 En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197 y 28-3p/451, o las razones inversas de los mismos.

45 En otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles adicionalmente para detectar las relaciones de expresión del par de miARN 101/140-3p, 106a/451, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 133a/451, 133a/660, 140-3p/660, 142-3p/15b, 15b/451, 15b/660, 17/451, 17/660, 17/92a, 197/19b, 197/451, 197/660, 197/92a, 19b/660, 28-3p/660, o 320/660, o las razones inversas de los mismos.

50 En aún otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197, 28-3p/451, 101/140-3p, 106a/451, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 133a/451, 133a/660, 140-3p/660, 142-3p/15b, 15b/451, 15b/660, 17/451, 17/660, 17/92a, 197/19b, 197/451, 197/660, 197/92a, 19b/660, 28-3p/660 o 320/660, o las relaciones inversas de los mismos.

55 En algunas realizaciones, al menos un cebador o sonda en la pluralidad de cebadores y sondas proporcionados en el kit es capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de un par de miARN en una muestra. En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas provistos en el kit comprende al menos un cebador o sonda capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197, 28-3p/451, 101/140-3p, 106a/451, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 133a/451, 133a/660, 140-3p/660, 142-3p/15b, 15b/451, 15b/660, 17/451, 17/660, 17/92a, 197/19b, 197/451, 197/660, 197/92a, 19b/660, 28-3p/660 o 320/660 en una muestra.

65 Firma del "riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo"

Se proporciona también un método para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo en un sujeto. El método comprende:

- 5 (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;
- (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;
- 10 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);
- 15 (d) repetir las etapas (a) a (c) para pares adicionales de miARN hasta que (1) al menos catorce relaciones de expresión de pares de miARN se les asigna una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 28 pares de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN,
- 20 donde los pares de miARN comprenden 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660, o 28-3p/660, o las razones inversas de los mismos; y
- (e) categorizar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo como (i) positivo si al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tienen una puntuación positiva, o (ii) negativo si se asignan puntuaciones positivas a menos de catorce relaciones de expresión del par de miARN.
- 25 En algunas realizaciones, los pares de miARN de este ensayo comprenden más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6, más de 7, más de 8, más de 9, o cada uno de los relaciones 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660, y 28-3p/660, o las razones inversas de los mismos.
- 30 En otras realizaciones, los pares de miARN pueden comprender adicionalmente las proporciones 106a/451, 126/451, 145/197, 17/451, 197/21, 197/30b, 197/30c, 197/451, 197/92a, 19b/451, 21/221, 21/28-3p, 28-3p/30b, 28-3p/30c, 28-3p/451, 28-3p/92a, 320/451, o 320/92a, o el razones inversas de los mismos.
- 35 En aún otras realizaciones, los pares de miARN comprenden al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, o cada una de las proporciones 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660, 28-3p/660, 106a/451, 126/451, 145/197, 17/451, 197/21, 197/30b, 197/30c, 197/451, 197/92a, 19b/451, 21/221, 21/28-3p, 28-3p/30b, 28-3p/30c, 28-3p/451, 28-3p/92a, 320/451 y 320/92a, o sus relaciones inversas. El experto en la materia entendería que se esperaría que la utilización de algunas de estas 28 relaciones, pero no de todas, proporcionara un ensayo que identificara con precisión el riesgo de manifestar un tumor agresivo.
- 40 En algunas realizaciones, la invención proporciona el uso de una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de 28 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico o pronóstico útil para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo en un sujeto, en el que la detección comprende:
- 45 (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;
- (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;
- 50 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);
- 55 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 28 pares de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN,
- 60 donde los pares de miARN comprenden 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660, o 28-3p/660, o las razones inversas de los mismos; y
- (e) categorizar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo como (i) positivo si al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tienen una puntuación positiva, o (ii) negativo si se asignan puntuaciones positivas a menos de catorce relaciones de expresión del par de miARN.
- 65 En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6, más de 7, más de 8, más de 9 o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/142-

3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660 y 28-3p/660, o sus relaciones inversas.

5 En otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles adicionalmente para detectar las relaciones de expresión del par de miARN 106a/451, 126/451, 145/197, 17/451, 197/21, 197/30b, 197/30c, 197/451, 197/92a, 19b/451, 21/221, 21/28-3p, 28-3p/30b, 28-3p/30c, 28-3p/451, 28-3p/92a, 320/451, o 320/92a, o las relaciones inversas de los mismos.

10 En aún otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27 o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660, 28-3p/660, 106a/451, 126/451, 145/197, 17/451, 197/21, 197/30b, 197/30c, 197/451, 197/92a, 19b/451, 21/221, 21/28-3p, 28-3p/30b, 28-3p/30c, 28-3p/451, 28-3p/92a, 320/451, y 320/92a, o sus relaciones inversas. El experto en la materia entendería que se esperaba que la utilización de algunas de estas 28 relaciones, pero no todas, proporcionara un ensayo que identificara con precisión el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo.

20 En otras realizaciones, la invención proporciona un kit para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo en un sujeto. El kit comprende una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de 28 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico o pronóstico e instrucciones para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo en un sujeto que utiliza la pluralidad de cebadores o sondas. Las instrucciones comprenden:

(a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

25 (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

30 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

35 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 28 pares de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN,

donde los pares de miARN comprenden 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660, o 28-3p/660, o las razones inversas de los mismos; y

40 (e) categorizar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo como (i) positivo si al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tienen una puntuación positiva, o (ii) negativo si se asignan puntuaciones positivas a menos de catorce relaciones de expresión del par de miARN.

45 En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6, más de 7, más de 8, más de 9, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660 y 28-3p/660, o sus relaciones inversas.

50 En otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles adicionalmente para detectar las relaciones de expresión del par de miARN 106a/451, 126/451, 145/197, 17/451, 197/21, 197/30b, 197/30c, 197/451, 197/92a, 19b/451, 21/221, 21/28-3p, 28-3p/30b, 28-3p/30c, 28-3p/451, 28-3p/92a, 320/451, o 320/92a, o las relaciones inversas de los mismos.

55 En aún otras realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas son útiles para detectar al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27 o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660, 28-3p/660, 106a/451, 126/451, 145/197, 17/451, 197/21, 197/30b, 197/30c, 197/451, 197/92a, 19b/451, 21/221, 21/28-3p, 28-3p/30b, 28-3p/30c, 28-3p/451, 28-3p/92a, 320/451 y 320/92a, o las relaciones inversas de los mismos.

60 En algunas realizaciones, al menos un cebador o sonda en la pluralidad de cebadores y sondas proporcionados en el kit es capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de un par de miARN en una muestra. En algunas realizaciones, la pluralidad de cebadores o sondas provistos en el kit comprende al menos un cebador o sonda capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, o cada una de las relaciones de expresión del par de miARN 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-

3p/28-3p, 197/19b, 197/660, 28-3p/660, 106a/451, 126/451, 145/197, 17/451, 197/21, 197/30b, 197/30c, 197/451, 197/92a, 19b/451, 21/221, 21/28-3p, 28 -3p/30b, 28-3p/30c, 28-3p/451, 28-3p/92a, 320/451 y 320/92a en una muestra.

Clasificador de "riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar"

5

Los cuatro métodos anteriores se pueden combinar en un método para predecir el riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar en un sujeto. Ese método comprende:

10

(a) determinar la presencia de una firma de tumor pulmonar descrita anteriormente;

(b) determinar la presencia de una firma agresiva de tumor pulmonar descrita anteriormente;

(c) determinar el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar descrita anteriormente;

15

(d) determinar el riesgo de manifestar una firma agresiva de tumor pulmonar descrita anteriormente;

(e) categorizar al sujeto como de bajo riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar si ninguna de las firmas de las etapas (a)-(d) se categoriza como positiva;

20

(f) categorizar al sujeto como que tiene un riesgo intermedio de desarrollar o tener un tumor pulmonar si al menos la presencia de una firma de tumor pulmonar de la etapa (a) es positiva, o el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar de la etapa (c) es positivo; y tanto la presencia de una firma de tumor pulmonar agresivo de la etapa (b) como el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar agresivo de la etapa (d) son negativos; y

25

(g) categorizar al sujeto como alto riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar si al menos la presencia de una firma tumoral pulmonar agresiva de la etapa (b) es positiva o si el riesgo de manifestar una firma tumoral pulmonar agresiva de la etapa (d) es positivo.

30

Los cuatro usos anteriores se pueden combinar en un uso para predecir el riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar en un sujeto. Ese uso comprende:

(a) usar una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de los 27 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico útil para determinar la presencia de una firma de tumor pulmonar descrita anteriormente;

35

(b) usar una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de los 28 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico útil para determinar la presencia de una firma agresiva de tumor pulmonar descrita anteriormente; (c) usar una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de los 27 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico o pronóstico útil para determinar el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar descrita anteriormente;

40

(d) usar una pluralidad de cebadores o sondas útiles para detectar cualquiera de los 28 pares de miARN en la fabricación de un reactivo de diagnóstico o pronóstico útil para determinar el riesgo de manifestar una firma agresiva de tumor pulmonar descrita anteriormente;

45

(e) categorizar al sujeto como de bajo riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar si ninguna de las firmas de las etapas (a)-(d) se categoriza como positiva;

50

(f) categorizar al sujeto como que tiene un riesgo intermedio de desarrollar o tener un tumor pulmonar si al menos la presencia de una firma de tumor pulmonar de la etapa (a) es positiva, o el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar de la etapa (c) es positivo; y tanto la presencia de una firma de tumor pulmonar agresivo de la etapa (b) como el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar agresivo de la etapa (d) son negativos; y

55

(g) categorizar al sujeto como de alto riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar si al menos la presencia de una firma del tumor pulmonar agresivo de la etapa (b) es positiva o el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar agresivo de la etapa (d) es positivo.

A. Definiciones

60

El término "tumor pulmonar" utilizado aquí puede ser un tumor pulmonar benigno o maligno. El tumor pulmonar puede estar asociado con una o más afecciones pulmonares y puede tomar la forma de, por ejemplo, un ganglio pulmonar o una masa pulmonar.

65

El término "afección pulmonar" tal como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad, evento o cambio en el estado de salud relacionado con el pulmón, que incluye, por ejemplo, cáncer de pulmón y diversas afecciones no cancerosas. Ejemplos de afecciones pulmonares no cancerosas incluyen enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tumores pulmonares benignos o masas de células (por ejemplo, hamartoma, fibroma, neurofibroma), granuloma,

sarcoidosis e infecciones causadas por bacterias (por ejemplo, Tuberculosis) o patógenos fúngicos (por ejemplo, histoplasmosis). En ciertas realizaciones, una afección pulmonar puede estar asociada con la aparición de ganglios pulmonares radiográficos.

5 Los métodos anteriores no están estrechamente limitados a diagnosticar y/o pronosticar ningún cáncer de pulmón particular. Como se usa en el presente documento, “cáncer de pulmón” se refiere preferiblemente a cánceres de pulmón, pero puede incluir cualquier enfermedad u otro trastorno del sistema respiratorio de un ser humano u otro mamífero. Los trastornos neoplásicos respiratorios incluyen, por ejemplo, carcinoma microcítico o cáncer de pulmón microcítico (SCLC), carcinoma no microcítico o cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), carcinoma epidermoide (SCC), adenocarcinoma, carcinoma broncoalveolar (BAC)), carcinoma pulmonar mixto, mesotelioma pleural maligno, carcinoma de células grandes indiferenciado, carcinoma de células gigantes, tumores sincrónicos, carcinoma neuroendocrino de células grandes, carcinoma adenoepidermoide, carcinoma indiferenciado; y carcinoma microcítico, que incluye cáncer de células en grano de avena, carcinoma mixto microcítico/células grandes (LC), carcinoma de células grandes y carcinoma microcítico combinado; así como también carcinoma quístico adenoide, hamartomas, tumores mucoepidermoides, tumores pulmonares carcinoides típicos, tumores pulmonares carcinoides atípicos, tumores pulmonares carcinoides periféricos, tumores pulmonares carcinoides centrales, mesoteliomas pleurales, carcinoma pulmonar indiferenciado y cánceres que se originan fuera de los pulmones, como cánceres secundarios que han hecho metástasis a los pulmones desde otras partes del cuerpo, o cualquier otro cáncer de pulmón ahora conocido o descubierto más tarde. Los cánceres de pulmón pueden ser de cualquier etapa o grado.

20 El término “muestra biológica del sujeto” como se usa en el presente documento se refiere a una muestra de cualquier sujeto, incluidos fumadores, no fumadores, exfumadores, pacientes con cáncer (por ejemplo, para diagnosticar y/o controlar la recurrencia del cáncer después del tratamiento), antiguos pacientes con cáncer, etc. En realizaciones específicas, la muestra biológica se origina en un individuo fumador que, en el momento de la recolección de la muestra, no presenta un tumor pulmonar si se somete a métodos de diagnóstico por imágenes, en particular el individuo fumador que no presenta ganglios de dimensiones superiores a 5 mm si se someten a una tomografía computarizada en espiral.

25 El término “muestra biológica” como se usa en el presente documento puede ser cualquier tejido que proporcione una medición precisa del perfil de miARN en el sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica es un fluido biológico. Estas realizaciones no están limitadas estrechamente a ningún fluido corporal particular, ya que los miARN están presentes en esencialmente todos los fluidos corporales (Weber et al., *The microRNA spectrum in 12 body fluids*, *Clin Chem* 56:1733-1741, 2010; De Guire et al., *Clin Biochem* 46:846-860, 2013; véase también Rodríguez-Dorantes et al., *Meth Mol Biol* 1165:81-87, 2014). Ejemplos de fluidos corporales útiles son sangre periférica, suero, plasma, ascitis, orina, esputo, saliva, líquido de lavado broncoalveolar, líquido del quiste, líquido pleural, líquido peritoneal, linfa, pus, fluidos de lavado de las cavidades sinusales, aspirados broncopulmonares y aspirados de médula ósea. El experto en la materia puede determinar, sin excesiva experimentación, si algún fluido corporal particular es útil para cualquier aplicación particular. En algunas realizaciones, el fluido corporal es plasma o suero. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de tejido.

40 Como se usa en el presente documento, las formas singulares “un”, “una” y “el” pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, el uso de “o” tiene la intención de incluir “y/o”, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

45 Como se usa en el presente documento, un “individuo”, “sujeto”, “paciente” o “sujeto que lo necesita” es un individuo que tiene un riesgo de desarrollar un tumor o un tumor agresivo o uno que puede tener o puede estar afectado por o diagnosticado como tener un tumor o tumor agresivo. Estos términos se pueden utilizar indistintamente. Preferiblemente, el individuo es un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, un primate, un ave, un ratón, una rata, un ave, un perro, un gato, una vaca, un caballo, una cabra, un camello, una oveja o un cerdo. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

50 Como se usa en el presente documento, un “cebador” o una “sonda” en la pluralidad de cebadores o sondas es una molécula de ácido nucleico. El cebador o sonda puede ser ADN, ARN o cADN. La imprimación o sonda puede ser natural o sintética. El cebador o sonda puede ser al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 50, al menos 75, al menos 100 ácidos nucleicos de longitud. Preferiblemente, al menos un cebador o sonda en la pluralidad de cebadores y sondas es capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de un par de miARN en una muestra. Preferiblemente, la pluralidad de cebadores o sondas comprende al menos un cebador o sonda capaz de unirse selectivamente a al menos un miARN de todas las relaciones de expresión del par de miARN en una muestra. El término “unión selectiva” significa que el cebador o la sonda tiene una alta afinidad por la unión a al menos un miARN de un par de miARN en una muestra o una mayor afinidad por la unión a al menos un miARN de un par de miARN en comparación con cualquier otro miARN en una muestra. El término “cebador” significa que la molécula de ácido nucleico es capaz de servir como punto de partida para la síntesis de ADN. Es decir, las ADN polimerasas pueden iniciar la replicación desde el extremo 3' de un cebador.

65 Con cualquiera de los métodos anteriores, el término “la relación de expresión de un par de miARN” como se usa en este documento es la relación del nivel de expresión de dos miARN específicos. Debe apreciarse que las relaciones para cualquiera de los pares de miARN especificados en cualquiera de los métodos descritos en este documento podrían

calcularse como la relación inversa de la especificada. Como ejemplo no limitante, cuando los pares miARN para un método en particular son "106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b y 320/660, o sus ratios inversos, "la relación de expresión de cualquiera, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o trece de estos pares de miARN podría calcularse como la relación inversa, donde los valores de corte se ajustan en consecuencia .

El término "valor de corte" como se usa en el presente documento puede ser un número negativo o positivo. Con algunas proporciones, una relación de expresión que "excede el valor de corte" es un valor que es menor en magnitud que el valor de corte. Con otras proporciones, una relación de expresión que "excede el valor de corte" es un valor que es mayor en magnitud que el valor de corte. Véase, por ejemplo, la Tabla 9, donde ">" indica que un número mayor en magnitud que el valor de corte significa una relación que excede el corte, y "<" indica que un número menor en magnitud que el valor de corte significa una relación que excede el valor de corte.

Bajo esta definición de "excede el valor de corte", (i) un valor de -4.50 para la relación 133a/92a excede el valor de corte de -4.18 enumerado en la Tabla 9, (ii) un valor de 3.50 para la relación 17/451 excede el valor de corte de 3.33 enumerado en la Tabla 9, (iii) un valor de -1.80 para la relación 142-3p/17 excede el valor de corte de -1.95 enumerado en la Tabla 9, y (iv) un valor de 4.50 para la relación 16/197 excede el valor de corte de 5.00 enumerados en la Tabla 9.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, el valor de corte para la relación de expresión de cualquier par particular de miARN se determina a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control. El término "pluralidad de muestras de control" como se usa en el presente documento puede ser de cualquier población definida, por ejemplo, sujetos sanos sin antecedentes de cáncer, sujetos sanos sin antecedentes de cáncer de pulmón, sujetos que tienen cáncer de pulmón, sujetos que nunca fumaron, sujetos que han fumado pero que ya no fuman, etc. En una realización preferida, la pluralidad de muestras de control procede de sujetos sanos y el valor de corte es la relación promedio de la pluralidad de pares de miARN correspondientes de la pluralidad de muestras de control. En algunas de estas realizaciones, el término "promedio" como se usa en el presente documento puede ser la media o la mediana. En otras realizaciones, el corte es la media +/- una desviación estándar, o cualquier proporción menor o mayor de la desviación estándar, por ejemplo +/-1/2 desviación estándar, +/-3/4 desviación estándar, +/-1.5 estándar desviaciones, +/-2 desviaciones estándar, o cualquier proporción mayor, menor o intermedia de la desviación estándar.

El valor de corte se puede determinar sin experimentación excesiva para cualquier pluralidad de muestras de control de cualquier población de control utilizando métodos conocidos, por ejemplo, utilizando conjuntos de entrenamiento, como se describe en los Ejemplos. El punto de corte se establece para lograr la sensibilidad (SE), la especificidad (SP), el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) deseado.

Para la evaluación de estos métodos de diagnóstico (presencia de tumor, presencia de tumor agresivo) y métodos de pronóstico (riesgo de manifestar un tumor, riesgo de manifestar un tumor agresivo), las categorizaciones interpretan los resultados de las pruebas en el entorno clínico. El valor diagnóstico o pronóstico de los métodos se puede definir por su SE, SP, PPV y NPV. Cualquier método de prueba producirá Positivo Verdadero (TP), False Negativo Falso (FN), Positivo Falso (FP) y Negativo Verdadero (TN). La "sensibilidad" de una prueba es el porcentaje de todos los pacientes con enfermedad presente o que responden que tienen una prueba positiva o $(TP/TP+FN) \times 100\%$. La "especificidad" de una prueba es el porcentaje de todos los pacientes sin enfermedad o que no responden, que tienen una prueba negativa o $(TN/FP+TN) \times 100\%$. El "valor predictivo" o "PV" de una prueba es una medida (%) de las veces que el valor (positivo o negativo) es el valor verdadero, es decir, el porcentaje de todas las pruebas positivas que son positivos verdaderos es el Valor Predictivo Positivo (PV+) o $(TP/TP+FP) \times 100\%$. El "valor predictivo negativo" (PV) es el porcentaje de pacientes con una prueba negativa que no responderán o $(TN/FN+TN) \times 100\%$. Otra medida, la "precisión" o "eficiencia" de una prueba, es el porcentaje de veces que la prueba da la respuesta correcta en comparación con el número total de pruebas o $(TP+TN/TP+TN+FP+FN) \times 100\%$. La "tasa de error" se calcula a partir de aquellos pacientes que se predice que responderán que no respondieron y aquellos pacientes que respondieron que no se esperaba que respondieran o $(FP+FN/TP+TN+FP+FN) \times 100\%$. La "especificidad" global de la prueba es una medida de la precisión de la sensibilidad y la especificidad de una prueba. No cambia ya que la probabilidad general de cambios de la enfermedad en una población cambia el valor predictivo. El PV cambia con la evaluación clínica de un médico de la presencia o ausencia de enfermedad o la presencia o ausencia de respuesta clínica en un paciente determinado.

Para cualquier prueba dada, el experto puede determinar y ajustar TP, FN, FP y TN sin una experimentación excesiva, por ejemplo, ajustando el valor de corte, ajustando la significación estadística (por ejemplo, el valor P) para hacer una determinación pronóstica o diagnóstica; ajustar la precisión de los procedimientos de prueba, etc.

B. Métodos

Los niveles de expresión de los miARN pueden determinarse por cualquier medio conocido en la técnica. En algunas realizaciones, los niveles de expresión se determinan haciendo copias de cADN de cada miARN en cada par de miARN usando la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR). En diversas realizaciones, la relación de expresión se determina adicionalmente usando PCR en tiempo real. En realizaciones específicas de estos métodos, la relación de expresión se determina adicionalmente usando sondas TaqMan. Sin embargo, los métodos no están

limitados a esas realizaciones y pueden ponerse en práctica usando cualquier método apropiado ahora conocido o posteriormente descubierto para determinar los niveles de expresión de miARN.

5 En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el miARN se amplifica antes de la medición. En otras realizaciones, el nivel de esos ácidos nucleicos se mide durante el proceso de amplificación. En otros métodos más, los ácidos nucleicos no se amplifican antes de la medición.

10 Existen muchos métodos para amplificar secuencias de ácidos nucleicos de miARN tales como miARN maduros, miARN precursores y miARN primarios. Las técnicas adecuadas de polimerización y amplificación de ácidos nucleicos incluyen transcripción inversa (RT), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real (PCR cuantitativa (q-PCR)), amplificación de la secuencia de ácido nucleico (NASBA), reacción en cadena de la ligasa, amplificación de sonda ligable múltiple, tecnología de invasor (tercera onda), amplificación de círculo rodante, transcripción in vitro (IVT), amplificación de desplazamiento de cadena, amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación de ARN (Eberwine) y otros métodos que son conocidos por personas expertas en el arte. En ciertas realizaciones, se usa más de un método de amplificación, tal como la transcripción inversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). En los métodos de PCR y q-PCR, por ejemplo, se usa un conjunto de cebadores para cada secuencia diana. En ciertas realizaciones, las longitudes de los cebadores dependen de muchos factores, que incluyen, pero no se limitan a, la temperatura de hibridación deseada entre los cebadores, la secuencia de ácido nucleico diana y la complejidad de las diferentes secuencias de ácido nucleico diana a amplificar. En ciertas realizaciones, un cebador tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nucleótidos. En otras realizaciones, un cebador tiene una longitud igual o inferior a 15, 20, 25, 30 o 35 nucleótidos. En realizaciones adicionales, un cebador tiene al menos 35 nucleótidos de longitud.

25 En un aspecto adicional, un cebador directo puede comprender al menos una secuencia que se hibrida con un miARN y, como alternativa, puede comprender una región 5' no complementaria adicional. En otro aspecto, se puede diseñar un cebador inverso para hibridar con el complemento de un miARN transcrito de forma inversa. El cebador inverso puede ser independiente de la secuencia de miARN, y múltiples biomarcadores de miARN pueden amplificarse usando el mismo cebador inverso. Alternativamente, un cebador inverso puede ser específico para un biomarcador de miARN.

30 La reacción de qRT-PCR puede combinarse además con la reacción de transcripción inversa incluyendo tanto una transcriptasa inversa como una polimerasa de ADN termoestable basada en ADN. Cuando se usan dos polimerasas, se puede usar un enfoque de "arranque en caliente" para maximizar el rendimiento del ensayo (Patentes de Estados Unidos No. 5,411,876 y 5,985,619). Por ejemplo, los componentes para una reacción de transcriptasa inversa y una reacción de PCR pueden secuestrarse usando uno o más métodos de termoactivación o alteración química para mejorar la eficacia de polimerización (Patentes de Estados Unidos No. 5,550,044, 5,413,924 y 6,403,341).

35 En ciertas realizaciones, se usan marcadores, colorantes o sondas y/o cebadores marcados para detectar miARN amplificados o no amplificados. El experto en la técnica reconocerá qué métodos de detección son apropiados basándose en la sensibilidad del método de detección y la abundancia del objetivo. Dependiendo de la sensibilidad del método de detección y la abundancia del objetivo, la amplificación puede o no requerirse antes de la detección. Un experto en la técnica reconocerá los métodos de detección donde se prefiere la amplificación de miARN.

40 Una sonda o cebador puede incluir bases de Watson-Crick o bases modificadas. Las bases modificadas incluyen, pero no se limitan a, las bases AEGIS (de Eragen Biosciences), que se han descrito, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nos. 5,432,272, 5,965,364 y 6,001,983. En ciertos aspectos, las bases se unen mediante un enlace fosfodiéster natural o un ligador químico diferente. Los diferentes ligadores químicos incluyen, pero no se limitan a, un enlace peptídico o un ligador de Ácido Nucleico Bloqueado (LNA), que se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 7,060,809.

45 En un aspecto adicional, las sondas o cebadores de oligonucleótidos presentes en una reacción de amplificación son adecuados para controlar la cantidad de producto de amplificación producida en función del tiempo. En ciertos aspectos, se usan sondas que tienen diferentes caracteres monocatenarios frente a bicatenarios para detectar el ácido nucleico. Las sondas incluyen, pero no se limitan a, las sondas de ensayo de 5'-exonucleasa (por ejemplo, TaqMan™) (véase la Patente de Estados Unidos No. 5,538,848), balizas moleculares de bucle de vástago (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos No. 6,103,476 y 5,925,517), balizas sin vástago o lineales (véase, por ejemplo, WO 9921881, Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,485,901 y 6,649,349), balizas moleculares de ácido nucleico peptídico (PNA) (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos No. 6,355,421 y 6,593,091), balizas de PNA lineal (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 6,329,144), sondas que no son de FRET (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 6,150,097), sondas Sunrise™/AmplifluorB™ (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 6,548,250), sondas Scorpion™ de bucle - tallo y dúplex (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 6,589,743), sondas de bucle de abombamiento (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6,590,091), sondas de pseudo nudo (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6,548,250), ciclones (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6,383,752), sonda MGB Eclipse™ (Epoch Biosciences), sondas en horquilla (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 6,596,490), sondas de iluminación PNA, sondas de extinción anticebador (Li et al., Clin. Chem. 53: 624-633 (2006)), sondas de nanopartículas autoensambladas, y sondas modificadas con ferroceno descritas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 6,485,901.

5 En ciertas realizaciones, uno o más de los cebadores en una reacción de amplificación incluye una etiqueta. En aún otras realizaciones, diferentes sondas o cebadores comprenden etiquetas detectables que se pueden distinguir entre sí. En algunas realizaciones, un ácido nucleico, tal como la sonda o cebador, puede etiquetarse con dos o más etiquetas distinguibles.

En algunas realizaciones, la concentración del miARN se mide usando una micromatriz u otro soporte.

10 Una "micromatriz" es una matriz lineal o bidimensional o tridimensional (y en fase sólida) de regiones discretas, teniendo cada una un área definida, formada en la superficie de un soporte sólido tal como, pero no limitado a, vidrio, plástico o membrana sintética. La densidad de las regiones discretas en una micromatriz está determinada por el número total de polinucleótidos inmovilizados a detectar en la superficie de un único soporte en fase sólida, tal como de al menos aproximadamente 50/cm², al menos aproximadamente 100/cm², o en al menos alrededor de 500/cm², hasta alrededor de 1,000/cm² o más. Las matrices pueden contener menos de aproximadamente 500, aproximadamente 1000, 15 aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, aproximadamente 2500, aproximadamente 3000 o más polinucleótidos inmovilizados en total. Tal como se usa en el presente documento, una micromatriz de ADN es una matriz de sondas oligonucleotídicas o polinucleotídicas colocadas en un chip u otras superficies usadas para hibridar con polinucleótidos amplificados o clonados a partir de una muestra. Dado que la posición de cada grupo particular de sondas en la matriz es conocida, las identidades de una muestra de polinucleótidos pueden determinarse basándose en su unión a una posición 20 particular en la micromatriz.

Como alternativa al uso de una micromatriz, se puede usar una matriz de cualquier tamaño sobre un soporte en la práctica de la divulgación, que incluye una disposición de una o más posiciones de una disposición bidimensional o tridimensional para detectar la expresión de un miARN

25 En algunos aspectos, una etiqueta se adjunta a una o más sondas y tiene una o más de las siguientes propiedades:

(i) proporciona una señal detectable; (ii) interactúa con una segunda etiqueta para modificar la señal detectable proporcionada por la segunda etiqueta, por ejemplo, FRET (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente); (iii) 30 estabiliza la hibridación, por ejemplo, formación dúplex; y (iv) proporciona un miembro de un complejo de unión o conjunto de afinidad, por ejemplo, afinidad, anticuerpo-antígeno, complejos iónicos, hapteno-ligando (por ejemplo, biotina-avidina). En otros aspectos más, el uso de marcadores se puede lograr usando cualquiera de una gran cantidad de técnicas conocidas que emplean marcadores conocidos, enlaces, grupos de enlace, reactivos, condiciones de reacción y métodos de análisis y purificación.

35 Los miARN pueden detectarse mediante métodos directos o indirectos. En un método de detección directa, se detectan uno o más miARN mediante un marcador detectable que está unido a una molécula de ácido nucleico. En dichos métodos, los miARN pueden marcarse antes de unirse a la sonda. Por lo tanto, la unión se detecta mediante la detección del miARN marcado que está unido a la sonda. La sonda está opcionalmente unida a un cordón en el volumen de reacción.

40 En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos se detectan por unión directa con una sonda marcada, y la sonda se detecta posteriormente. En una realización de la invención, los ácidos nucleicos, tales como los miARN amplificados, se detectan utilizando microesferas FlexMAP (Luminex) conjugadas con sondas para capturar los ácidos nucleicos deseados. Algunos métodos pueden implicar la detección con sondas de polinucleótidos modificadas con etiquetas fluorescentes o detección de ADN ramificado (bADN), por ejemplo.

45 En otras realizaciones, los ácidos nucleicos se detectan por métodos de detección indirectos. Por ejemplo, una sonda biotinilada se puede combinar con un colorante conjugado con estreptavidina para detectar el ácido nucleico unido. La molécula de estreptavidina se une a una etiqueta de biotina en miARN amplificado, y el miARN unido se detecta mediante la detección de la molécula de colorante unida a la molécula de estreptavidina. En una realización, la molécula de tinte conjugada con estreptavidina comprende Phycolink® Streptavidin R-Phycoerythrin (PROzyme). Los expertos en la técnica conocen otras moléculas de tinte conjugado.

50 Las etiquetas incluyen, pero no están limitadas a: compuestos emisores de luz, dispersores de luz y absorbentes de luz que generan o inactivan una señal fluorescente, quimioluminiscente o bioluminiscente detectable (véase, por ejemplo, Kricka, L., ADN no isotópico). Probe Techniques, Academic Press, San Diego (1992) y Garman A., etiquetado no radiactivo, Academic Press (1997)). Los colorantes indicadores fluorescentes útiles como marcadores incluyen, pero sin limitación, fluoresceínas (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5,188,934, 6,008,379 y 6,020,481), rodaminas (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5,366,860, 5,847,162, 5,936,087, 6,051,719 y 6,191,278), benzofenoxazinas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6,140,500), colorantes fluorescentes de transferencia de energía, que comprenden pares de donantes y aceptores (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos No. 5,863,727, 5,800,996 y 5,945,526). y cianinas (véase, por ejemplo, WO 9745539), lisamina, ficoeritrina, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX (Amersham), Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 60 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPYTRX, Azul Cascade, Cy3, Cy5, 6-FAM, isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, Verde Oregon 488, Verde Oregon 500, Verde Oregon 514, Azul Pacífico, REG, Verde de Rodamina, Rojo de Rodamina, Renographin, ROX, SYPRO, TAMRA, tetrametilrodamina y/o Rojo Texas, así

como cualquier otra fracción fluorescente capaz de generar una señal detectable . Los ejemplos de colorantes de fluoresceína incluyen, pero sin limitación, 6-carboxifluoresceína; 2', 4', 1,4,-tetraclorofluoresceína; y 2', 4', 5', 7', 1,4-hexaclorofluoresceína. En ciertos aspectos, la etiqueta fluorescente se selecciona de Verde SYBR, 6-carboxifluoresceína ("FAM"), TET, ROX, VICTM y JOE. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los marcadores son fluoróforos diferentes capaces de emitir luz a diferentes longitudes de onda que se pueden resolver espectralmente (por ejemplo, fluoróforos de 4 colores diferentes); ciertas sondas etiquetadas de este tipo son conocidas en la técnica y se describen anteriormente, y en la patente de Estados Unidos No. 6,140,054. En algunas realizaciones se usa una sonda fluorescente doble etiquetada que incluye un fluoróforo informador y un fluoróforo atenuador. Se apreciará que se eligen pares de fluoróforos que tienen espectros de emisión distintos para que puedan distinguirse fácilmente.

En otro aspecto adicional, los marcadores son restos estabilizadores de hibridación que sirven para potenciar, estabilizar o influir en la hibridación de dúplex, por ejemplo, intercaladores y colorantes intercalados (que incluyen, pero no se limitan a, bromuro de etidio y Verde SYBR), aglutinantes de surco menor y grupos funcionales de entrecruzamiento (véase, por ejemplo, Blackburn et al., eds., "DNA and RNA Structure" en *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* (1996)).

En otros aspectos, se pueden usar métodos que dependen de la hibridación y/o ligación para cuantificar miARN, incluidos los métodos y métodos de ligadura de oligonucleótidos que permiten que una sonda distinguible que se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana se separe de una cadena libre sonda. Como ejemplo, las sondas similares a HARP, como se describe en la Publicación de Estados Unidos No. 2006/0078894 pueden utilizarse para medir la cantidad de miARN.

En una realización adicional del método, puede utilizarse una reacción de ligación de sonda para cuantificar miARN. En una técnica de amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiple (MLPA) (Schouten et al., *Nucleic Acids Research* 30:e57 (2002)), pares de sondas que hibridan inmediatamente adyacentes entre sí en el ácido nucleico diana se ligan entre sí solamente en presencia del ácido nucleico diana. En algunos aspectos, las sondas MLPA tienen sitios de unión a cebador de PCR flanqueantes. Las sondas MLPA solo pueden amplificarse si se han ligado, lo que permite la detección y cuantificación de biomarcadores de miARN.

C. Detección de hemólisis

La hemólisis de glóbulos rojos y plaquetas libera miARN que pueden interferir con los métodos anteriores (Kirschner et al., *PLoS One* 6: e24145, 2011; Pritchard et al., *Cancer Prev Res (Phila)* 5: 492-497, 2012). Por lo tanto, en algunas realizaciones de los métodos anteriores, la hemólisis se determina en la muestra biológica y la muestra no se somete al método si se determina la hemólisis.

La hemólisis puede determinarse en las muestras objeto por cualquier medio conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la hemólisis se determina espectrofotométricamente, por ejemplo, midiendo la absorbancia a diferentes longitudes de onda (414 nm, 541 nm, 576nm) para identificar la presencia y cantidad de hemoglobina libre en la muestra (Kirschner et al., 2011).

En otras realizaciones, la hemólisis se determina analizando los niveles de expresión de miARN relacionados con la hemólisis que se regulan por aumento en muestras hemolizadas. En algunas de estas realizaciones, se utilizan cualquiera de los miARN miR-451, miR-486-5p, miR-16, miR-92a o miR-140-3p, que están significativamente regulan por aumento en muestras hemolizadas frente a muestras no hemolizadas. En diversos aspectos de estas realizaciones, los miARN relacionados con hemólisis son miR-451, miR-486-5p, miR16 y miR-92a.

En realizaciones adicionales, se determinan los niveles de expresión de una pluralidad de miARN normalizadores que no están regulan por aumento en muestras hemolizadas, y se usan para normalizar los niveles de expresión de los miARN relacionados con la hemólisis. Estos miARN normalizadores se pueden usar en proporciones con miARN relacionados con hemólisis para normalizar los niveles de expresión determinados de los últimos miARN. En algunas de estas realizaciones, los miARN normalizadores comprenden miR-126, miR-15b, miR221 y miR-30b.

Firma de "Hemólisis"

En algunas realizaciones, la hemólisis se determina adicionalmente por:

(a) determinar la relación de expresión de cada uno de 16 pares de miARN que consiste en cada uno de miR-451, miR-486-5p, miR-16 y miR-92a emparejados con cada uno de miR-126, miR-15b, miR-221 y miR-30b (es decir, miR-451/miR-126, miR-451/miR-15b, miR-451/miR-221, miR-451/miR-30b, miR-486-5p/miR-126, miR -486-5p/miR-15b, miR-486-5p/miR-221, miR486-5p/miR-30b, miR-16/miR-126, miR-16/miR-15b, miR-16/miR-221, miR-16/miR-30b, miR-92a/miR-126, miR92a/miR-15b, miR-92a/miR-221, y miR-92a/miR-30b o las relaciones inversas de los mismos) en la muestra;

(b) comparar cada una de las 16 relaciones de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado para cada relación de expresión de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

(c) para cada uno de los 16 pares de miARN, asignar una puntuación positiva para la relación de expresión en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b) o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b); y

5 (d) categorizar la muestra como (i) tener hemólisis si ocho o más de las 16 relaciones excede el valor de corte, o (ii) no tener hemólisis si menos de ocho de las 16 relaciones excede el valor de corte.

10 Como con los ensayos de diagnóstico y pronóstico descritos anteriormente, el valor de corte de este ensayo de hemólisis depende de la población de control, por ejemplo, el límite en el que se usa una pluralidad de muestras de suero no hemolizadas ya que las muestras de control serán diferentes que el punto de corte donde se usa una pluralidad de muestras de suero hemolizadas como muestras de control. Ver ejemplos. Adicionalmente, el punto de corte se puede ajustar, por ejemplo, para lograr los valores SE, SP, PPV y NPV deseados. En algunas realizaciones en las que se usan muestras de suero no hemolizadas como las muestras de control, el corte será la relación promedio (media o mediana) de la pluralidad de muestras de control. Opcionalmente, este corte tendrá una proporción +/- de una desviación estándar para tener en cuenta las diferencias en la variabilidad entre las muestras utilizadas para determinar el valor de corte.

15 En diversas realizaciones, cualquiera de los ensayos de hemólisis que usan niveles de expresión de miARN descritos anteriormente también se combina con otro ensayo de hemólisis, por ejemplo, el ensayo espectrofotométrico descrito en Kirschner et al., 2011.

20 D. Combinaciones de diagnóstico

25 Como se discutió en los Ejemplos, combinar la firma MSC descrita con tomografía computarizada de dosis baja (LDCT) permite detectar cánceres adicionales no detectados por LDCT, elevando la sensibilidad de detección del 87% para MSC solo y 84% para LDCT solo al 98% cuando LDCT se combina con MSC. En combinación con los ensayos de detección del cáncer distintos de LDCT, se esperaría que los métodos diagnósticos y pronósticos anteriores mostraran mejoras similares en la sensibilidad diagnóstica.

30 Los costes de atención médica de la detección LDCT y los procedimientos de seguimiento asociados son importantes. Un modelo de impacto presupuestario reciente que considera LDCT como ampliamente adoptado en los Estados Unidos indicó que la detección LDCT evitaría hasta 8100 muertes prematuras por cáncer de pulmón a una tasa de detección del 75% con un coste de detección adicional de USD\$240,000 para evitar una muerte por cáncer de pulmón (Goulart et al., 2012). Complementar la detección de LDCT con una prueba de biomarcadores no invasivos, al reducir los costes a la baja, podría aumentar el número de personas incluidas en la detección LDCT (Peres, J Natl Cancer Inst 105: 1-2, 2013).

35 Por lo tanto, cualquiera de los métodos de diagnóstico o pronóstico descritos anteriormente se puede combinar con un examen del sujeto para el cáncer de pulmón usando un sistema que no comprende el análisis de la expresión de miARN. El sistema puede utilizarse antes, al mismo tiempo o después del análisis de expresión de miARN. Se esperaría que cualquier sistema ahora conocido o más tarde descubierto se beneficie de un análisis adicional con MSC. Los ejemplos no limitantes de tales sistemas incluyen un análisis de sangre, una radiografía, una tomografía computarizada, una tomografía por emisión de positrones, una toracocentesis, una broncoscopia, una aspiración con aguja fina, una toracoscopia, una toracotomía o una mediastinoscopia. En algunas realizaciones, el sistema es una tomografía computarizada de dosis baja (LDCT).

45 E. Monitoreo

50 Cualquiera de los métodos anteriores se puede usar para controlar al sujeto en busca de cáncer de pulmón y/o riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Un sujeto es monitoreado cuando cualquiera de los métodos anteriores se realiza en al menos dos muestras biológicas diferentes que fueron tomadas del sujeto en diferentes momentos. En algunas realizaciones, al menos una de las al menos dos muestras biológicas diferentes se toma del sujeto después de que el sujeto ha sido tratado por cáncer de pulmón. Tal monitoreo evalúa la recurrencia o el riesgo de recurrencia del cáncer de pulmón.

55 F. Tratamiento

60 Los métodos anteriores se pueden utilizar para seleccionar opciones de tratamiento. Como se usa en este documento, el término "tratar" pretende describir la administración de un agente para eliminar o reducir en severidad un signo o síntoma de cáncer de pulmón. Alternativamente, o adicionalmente, un trastorno que puede ocurrir en múltiples ubicaciones se trata si la terapia se aplica a ese trastorno en al menos una de las múltiples ubicaciones.

65 De acuerdo con una realización, los métodos anteriores pueden utilizarse para seleccionar opciones de tratamiento cuando el sujeto no es tratado por cáncer de pulmón si se determina una presencia o riesgo negativo, o si se determina un riesgo bajo en el método combinado para predecir el riesgo de desarrollar o tener un tumor. En otra realización, un sujeto es tratado por cáncer de pulmón si se determina una presencia o riesgo positivo, o si se determina un riesgo intermedio o alto en el método combinado.

Por lo tanto, también se proporciona aquí un método para establecer opciones de tratamiento del cáncer de pulmón para un sujeto. El método comprende probar al sujeto usando los métodos de diagnóstico y/o pronóstico descritos anteriormente, y determinar las opciones de tratamiento de acuerdo con los resultados del método. El método puede comprender además administrar un tratamiento al sujeto que lo necesita.

5

G. miARN

10

En general, 24 miARN pueden componer la firma de la presencia de un tumor pulmonar (PD), la firma de la presencia de un tumor pulmonar agresivo (PAD), la firma del riesgo de manifestar un tumor pulmonar (RD), y la firma del riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (RAD). La Tabla 1 menciona esos 24 miARN que pueden estar presentes en cada firma.

Tabla 1

miARN
hsa-miR-16
hsa-miR-17
hsa-miR-21
hsa-miR-101
hsa-miR-126
hsa-miR-145
hsa-miR-197
hsa-miR-221
hsa-miR-320
hsa-miR-451
hsa-miR-660
hsa-miR-106a
hsa-miR-133a
hsa-miR-140-3p
hsa-miR-140-5p
hsa-miR-142-3p
hsa-miR-148a
hsa-miR-15b
hsa-miR-19b
hsa-miR-28-3p
hsa-miR-30b
hsa-miR-30c
hsa-miR-486-5p
hsa-miR-92a

15

La Tabla 2 proporciona un resumen del miARN para su uso en todos los aspectos de la presente invención.

ES 2 686 631 T3

Tabla 2

Nombre de miARN	Secuencia
hsa-miR-7-2 (pre-miR)	CUGGAUACAGAGUGGACCGGCUGGCCCAUCUGGAAGACUAGU GAUUUUGUUGUUGUCUACUGCGCUCAACAACAAAUCCCAGUC UACCUAAUGGUGCCAGCCAUCGCA (SEQ ID NO:1)
hsa-miR-7-2-5p (brazo 5' miR maduro)	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU (SEQ ID NO:2)
hsa-miR-7-2-3p (brazo 3' miR maduro)	CAACAAAUCCCAGUCUACC UAA (SEQ ID NO:3)
hsa-miR-15b (pre-miR)	UUGAGGCCUUAAAGUACUGUAGCAGCACAUCAUGGUUUACAUG CUACAGUCAAGAUGCGAAUCAUUUUUGCUGCUCUAGAAAUUU AAGGAAAUUC AU (SEQ ID NO:4)
hsa-miR-15b-5p (brazo 5' miR maduro)	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA (SEQ ID NO:5)
hsa-miR-15b-3p (brazo 3' miR maduro)	CGAAUCAUUUUUGCUGCUCUA (SEQ ID NO:6)
hsa-miR-16-1 (pre-miR de Chr.13)	GUCAGCAGUGCCUUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUUAAGAUU CUAAAUAUUCUCCAGUAUUAAACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUU GAC (SEQ ID NO:7)
hsa-miR-16-2 (pre-miR de Chr.3)	GUUCCACUCUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUAGUGAAAUAUA UAUUAAACACCAAUAUUACUGUGCUGCUUUAGUGUGAC (SEQ ID NO:8)
hsa-miR-16-5p (brazo 5' miR maduro)	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG (SEQ ID NO:9)
hsa-miR-16-3p (brazo 3' miR maduro)	CCAAUAUUACUGUGCUGCUUUA (SEQ ID NO:10)
hsa-miR-17 (pre-miR)	GUCAGAAUAUGUCAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGUGAUUAUG UGCAUCUACUGCAGUGAAGGCACUUGUAGCAUUUAUGGUGAC (SEQ ID NO:11)
hsa-miR-17-5p (brazo 5' miR maduro)	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG (SEQ ID NO:12)
hsa-miR-17-3p (brazo 3' miR maduro)	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG (SEQ ID NO:13)
hsa-miR-19b-1 (pre-miR de Chr. 13)	CACUGUUCUAUGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGCUGUGU GAUAUUCUGCUGUGCAAUCCAUGCAAACUGACUGUGGUAGU G (SEQ ID NO:14)
hsa-miR-19b-1-5p (brazo 5' miR maduro de Chr. 13)	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC (SEQ ID NO:15)
hsa-miR-19b-2 (pre-miR de Chr. X)	ACAUUGCUACUUACAAUAGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCAGCG UAUAUAUGUAUAUGUGGCUGUGCAAUCCAUGCAAACUGAUU GUGAUAUUGU (SEQ ID NO:16)
hsa-miR-19b-2-5p (brazo 5' miR maduro de Chr. X)	AGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCA (SEQ ID NO:17)
hsa-miR-19b-3p (brazo 3' miR maduro de Chr. 13 o X)	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA (SEQ ID NO:18)
hsa-miR-21 (pre-miR)	UGUCGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAU GGCAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGACA (SEQ ID NO:19)
hsa-miR-21-5p (brazo 5' miR maduro)	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO:20)

ES 2 686 631 T3

hsa-miR-21-3p (brazo 3' miR maduro)	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU (SEQ ID NO:21)
hsa-miR-28 (pre-miR)	GGUCCUUGCCCUCAAGGAGCUCACAGUCUAUUGAGUUACCUUU CUGACUUUCCACUAGAUGUGAGCUCCUGGAGGGCAGGCACU (SEQ ID NO:22)
hsa-miR-28-5p (brazo 5' miR maduro)	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG (SEQ ID NO:23)
hsa-miR-28-3p (brazo 3' miR maduro)	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA (SEQ ID NO:24)
hsa-miR-30a (pre-miR)	GCGACUGUAAACAUCUCGACUGGAAGCUGUGAAGCCACAGAU GGGCUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGCUGC (SEQ ID NO:25)
hsa-miR-30a-5p (brazo 5' miR maduro)	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG (SEQ ID NO:26)
hsa-miR-30a-3p (brazo 3' miR maduro)	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC (SEQ ID NO:27)
hsa-miR-30b (pre-miR)	ACCAAGUUUCAGUUCAUGUAAACAUCUACACUCAGCUGUAAU ACAUGGAUUGGCUGGGAGGUGGAUGUUUACUUCAGCUGACUUG GA (SEQ ID NO:28)
hsa-miR-30b-5p (brazo 5' miR maduro)	UGUAAACAUCUACACUCAGCU (SEQ ID NO:29)
hsa-miR-30b-3p (brazo 3' miR maduro)	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC (SEQ ID NO:30)
hsa-miR-30c-1 (pre-miR de Chr. 1)	ACCAUGCUGUAGUGUGUAAACAUCUACACUCUCAGCUGUG AGCUCAAGGUGGCUGGGAGAGGGUUGUUUACUCCUUCGCCAU GGA (SEQ ID NO:31)
hsa-miR-30c-1-3p (brazo 3' miR maduro de Chr. 1)	CUGGGAGAGGGUUGUUUACUCC (SEQ ID NO:32)
hsa-miR-30c-2 (pre-miR de Chr. 6)	AGAUACUGUAAACAUCUACACUCUCAGCUGUGGAAAGUAAGA AAGCUGGGAGAAGGCUGUUUACUCUUUCU (SEQ ID NO:33)
hsa-miR-30c-5p (brazo 5' miR maduro de Chr. 1 o 6)	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC (SEQ ID NO:34)
hsa-miR-30c-2-3p (brazo 3' miR maduro de Chr. 6)	CUGGGAGAAGGCUGUUUACUCU (SEQ ID NO:35)
hsa-miR-30d (pre-miR)	GUUGUUGUAAACAUCUCCCGACUGGAAGCUGUAAGACACAGCUA AGCUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGCUAC (SEQ ID NO:36)
hsa-miR-30d-5p (brazo 5' miR maduro)	UGUAAACAUCUCCCGACUGGAAG (SEQ ID NO:37)
hsa-miR-30d-3p (brazo 3' miR maduro)	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGC (SEQ ID NO:38)
hsa-miR-34b (pre-miR)	GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUAGCUGAUUGUACUGUGG UGGUUACAAUCACUAACUCCACUGCCAUCAAAACAAGGCAC (SEQ ID NO:39)
hsa-miR-34b-5p (brazo 5' miR maduro)	UAGGCAGUGUCAUAGCUGAUUG (SEQ ID NO:40)
hsa-miR-34b-3p (brazo 3' miR maduro)	CAAUCACUACUCCACUGCCAUC (SEQ ID NO:41)

ES 2 686 631 T3

hsa-miR-92a-1 (pre-miR de Chr. 13)	CUUUCUACACAGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCUGUGUUUCUGU AUGGUUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUUGAGUUUGG (SEQ ID NO: 42)
hsa-miR-92a-1-5p (brazo 5' miR maduro de Chr. 13)	AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCU (SEQ ID NO:43)
hsa-miR-92a-3p (brazo 3' miR maduro de Chr. 13 o X)	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU (SEQ ID NO:44)
hsa-miR-92a-2 (pre-miR de Chr. X)	UCAUCCUGGGUGGGGAUUUGUUGCAUUACUUGUGUUCUAUUAU AAAGUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUGGAAGA (SEQ ID NO: 45)
hsa-miR-92a-2-5p (brazo 5' miR maduro de Chr. X)	GGGUGGGGAUUUGUUGCAUUAC (SEQ ID NO:46)
hsa-miR-101-1 (pre-miR de Chr. 1)	UGCCCUGGCUCAGUUAUCACAGUGCUGAUGCUGUCUAUUCUAA AGGUACAGUACUGUGAUAAACUGAAGGAUGGCA (SEQ ID NO: 47)
hsa-miR-101-5p (brazo 5' miR maduro de Chr. 1 o 9)	CAGUUAUCACAGUGCUGAUGCU (SEQ ID NO:48)
hsa-miR-101-1-3p (brazo 3' miR maduro de Chr. 1)	UACAGUACUGUGAUAAACUGAA (SEQ ID NO:49)
hsa-miR-101-2 (pre-miR de Chr. 9)	ACUGUCCUUUUUCGGUUAUCAUGGUACCGAUGCUGUAUAUCUG AAAGGUACAGUACUGUGAUAAACUGAAGAAUGGUGGU (SEQ ID NO: 50)
hsa-miR-101-2-3p (brazo 3' miR maduro de Chr. 9)	UACAGUACUGUGAUAAACUGAA (SEQ ID NO:51)
hsa-miR-106a (pre-miR)	CCUUGGCCAUGUAAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGCUUUUUGA GAUCUACUGCAAUGUAAGCACUUCUUAUUAUACCAUGG (SEQ ID NO: 52)
hsa-miR-106a-5p (brazo 5' miR maduro)	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG (SEQ ID NO:53)
hsa-miR 106a-3p (brazo 3' miR maduro)	CUGCAAUGUAAGCACUUCUUAU (SEQ ID NO:54)
hsa-miR-126 (pre-miR)	CGCUGGCGACGGGACAUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUGACA CUUCAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGCCGUCCACGGCA (SEQ ID NO: 55)
hsa-miR-126-5p (brazo 5' miR maduro)	CAUUUUUACUUUUGGUACGCG (SEQ ID NO:56)
hsa-miR-126-3p (brazo 3' miR maduro)	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG (SEQ ID NO:57)
hsa-miR-133a-1 (pre-miR de Chr. 18)	ACAAUGC UUUGCUAGAGCUGGUAAA AUGGAACCAAUCGCCUC UUCAAUGGAUUUGUCCCUUCAACCAGCUGUAGCUAUGCAUU GA (SEQ ID NO: 58)
hsa-miR 133a-2 (pre-miR de Chr. 20)	GGGAGCCAAAUGC UUUGCUAGAGCUGGUAAA AUGGAACCAAU CGACUGUCCAAUGGAUUUGGUCCCUUCAACCAGCUGUAGCUG UGCAUUGAUGGCGCCG (SEQ ID NO: 59)

ES 2 686 631 T3

hsa-miR-133a (brazo 3' miR maduro de Chr. 18 o 20)	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG (SEQ ID NO:60)
hsa-miR-140 (pre-miR)	UGUGUCUCUCUCUGUGUCCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUA GGUUACGUCAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCACGGACAG GAUACCGGGGCACC (SEQ ID NO:61)
hsa-miR-140-5p (brazo 5' miR maduro)	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG (SEQ ID NO:62)
hsa-miR-140-3p (brazo 3' miR maduro)	UACCACAGGGUAGAACCACGG (SEQ ID NO:63)
hsa-miR-142 (pre-miR)	GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGAAAGCACUACUAACAGCA CUGGAGGGUGUAGUGUUCCUACUUUAUGGAUGAGUGUACUGU G (SEQ ID NO:64)
hsa-miR-142-5p (brazo 5' miR maduro)	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU (SEQ ID NO:65)
hsa-miR-142-3p (brazo 3' miR maduro)	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA (SEQ ID NO:66)
hsa-miR-144 (pre-miR)	UGGGGCCUGGCUGGGAUUAUCAUCAUAUACUGUAAGUUUGCGA UGAGACACUACAGUAUAGAUGAUGUACUAGUCCGGGCACCCCC (SEQ ID NO:67)
hsa-miR-144-5p (brazo 5' miR maduro)	GGAUUAUCAUCAUAUACUGUAAG (SEQ ID NO:68)
hsa-miR-144-3p (brazo 3' miR maduro)	UACAGUAUAGAUGAUGUACU (SEQ ID NO:69)
hsa-miR-145 (pre-miR)	CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCUUAGAU GCUAAGAUGGGGAUUCUGGAAAUACUGUUCUUGAGGUCAUGG UU (SEQ ID NO:70)
hsa-miR-145-5p (brazo 5' miR maduro)	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU (SEQ ID NO:71)
hsa-miR-145-3p (brazo 3' miR maduro)	GGAUUCCUGGAAUACUGUUCU (SEQ ID NO:72)
hsa-miR-148a (pre-miR)	GAGGCAAAGUUCUGAGACACUCCGACUCUGAGUAUGAUAGAAG UCAGUGCACUACAGAACUUUGUCUC (SEQ ID NO:73)
hsa-miR-148a-5p (brazo 5' miR maduro)	AAAGUUCUGAGACACUCCGACU (SEQ ID NO:74)
hsa-miR-148a-3p (brazo 3' miR maduro)	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU (SEQ ID NO:75)
hsa-miR-197 (pre-miR)	GGCUGUGCCGGGUAGAGAGGGCAGUGGGAGGUAAGAGCUCUUC ACCCUUCACCACCUUCUCCACCCAGCAUGGCC (SEQ ID NO:76)
hsa-miR-197-5p (brazo 5' miR maduro)	CGGGUAGAGAGGGCAGUGGGAGG (SEQ ID NO:77)
hsa-miR-197-3p (brazo 3' miR maduro)	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC (SEQ ID NO:78)
hsa-miR-200b (pre miR)	CCAGCUCGGGCAGCCGUGGCCAUUUACUGGGCAGCAUUGGAU GGAGUCAGGUCUCUAAUACUGCCUGGUAUUGAUGACGGCGGAG CCCUGCACG (SEQ ID NO:79)
hsa-miR-200b-5p (brazo 5' miR maduro)	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA (SEQ ID NO:80)
hsa-miR-200b-3p (brazo 3' miR maduro)	UAAUACUGCCUGGUAUUGAUGA (SEQ ID NO:81)

ES 2 686 631 T3

hsa-miR-205 (pre-miR)	AAAGAUCUCAGACAAUCCAUGUGCUUCUCUUGUCCUUCAUUC CACCGGAGUCUGUCUCAUACCCAACCAGAUUUCAGUGGAGUGA AGUUCAGGAGGCAUGGAGCUGACA (SEQ ID NO:82)
hsa-miR-205-5p (brazo 5' miR maduro)	UCCUJCAUUCACCGGAGUCUG (SEQ ID NO:83)
hsa-miR-205-3p (brazo 3' miR maduro)	GAUUUCAGUGGAGUGAAGUUC (SEQ ID NO:84)
hsa-miR-210 (pre-miR)	ACCCGGCAGUGCCUCCAGGGCAGGGCAGCCCCUGCCCACCGC ACACUGCGCUGCCCCAGACCCACUGUGCGUGUGACAGCGGCUG AUCUGUGCCUGGGCAGCGGACCC (SEQ ID NO:85)
hsa-miR-210 (miR maduro)	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA (SEQ ID NO:86)
hsa-miR-219-1 (pre-miR)	CCGCCCCGGGCCCGGGCUCUGAUUGUCCAAACGCAAUUCUG AGUCUAUGGCUCCGGCCGAGAGUUGAGUCUGGACGUCCCCGAGC CGCCGCCCCCAAACCUCGAGCGGG (SEQ ID NO:87)
hsa-miR-219-1-5p (brazo 5' miR maduro)	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU (SEQ ID NO:88)
hsa-miR-219-1-3p (brazo 3' miR maduro)	AGAGUUGAGUCUGGACGUCCG (SEQ ID NO:89)
hsa-miR-221 (pre-miR)	UGAACAUCCAGGUCUGGGGCAUGAACCGGCAUACAAUGUAGA UUUCUGUGUUCGUUAGGCAACAGCUACAUUGUCUGCGGGUUU CAGGCUACCUGGAAACAUGUUCUC (SEQ ID NO:90)
hsa-miR-221-5p (brazo 5' miR maduro)	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU (SEQ ID NO:91)
hsa-miR-221-3p (brazo 3' miR maduro)	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC (SEQ ID NO:92)
hsa-miR-320a (pre-miR)	GCUUCGCUCCCCUCCGCCUUCUCUUCUCCGGUUCUUCUCCGGAGU CGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAGGAUGAGGU (SEQ ID NO:93)
hsa-miR-320a (miR maduro)	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA (SEQ ID NO:94)
hsa-miR-320b-1 (pre-miR de Chr. 1: 117214371-117214449)	AAUUAUCCCUCUCUUCUAGUUCUCCUAGAGUGAGGAAAAG CUGGGUUGAGAGGGCAAACAAUUAACUAAUUAUU (SEQ ID NO:95)
hsa-miR-320b-2 (pre-miR de Chr. 1: 224444706-224444843)	UGUUAUUUUUGUCUUCUACCUAAGAAUUCUGUCUCUAGGCU UUCUCUUCUCCAGAUUCCCAAAGUUGGGAAAAGCUGGGUUGAG AGGGCAAAGGAAAAAAGAAUUCUGUCUCUGACAUAAUUA GAUAGGGAA (SEQ ID NO:96)
hsa-miR-320b (miR maduro de Chr. 1)	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA (SEQ ID NO:97)
hsa-miR-320c-1 (pre-miR de Chr. 18:19263471-19263558)	UUUGCAUJAAAAUGAGGCCUUCUCUUCUCCAGUUCUUCUCCAGA GUCAGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGUAGAAAAAUGAUGUA GG (SEQ ID NO:98)
hsa-miR-320c-2 (pre-miR de Chr. 18- 21901650-21901699)	CUUCUCUUCUCCAGUUCUUCUCCAGAAUUGGGAAAAGCUGGGUUG AGAGGGU (SEQ ID NO:99)

ES 2 686 631 T3

hsa-miR-320-c (miR maduro de Chr 18 loci)	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU (SEQ ID NO:100)
hsa-miR-320d-1 (pre-miR de Chr. 13)	UUCUCGUCCCAGUUCUCCCAAAGUUGAGAAAAGCUGGGUUGA GAGGA (SEQ ID NO:101)
hsa-miR-320d-2 (pre-miR de Chr. X)	UUCUCUCCCAGUUCUUCUUGGAGUCAGGAAAAGCUGGGUUGA GAGGA (SEQ ID NO:102)
hsa-miR-320d (miR maduro de Chr. 13 o X)	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA (SEQ ID NO:103)
hsa-miR-320e (pre-miR)	GCCUUCUCUCCCAGUUCUCCUGGAGUCGGGGAAAAGCUGGG UUGAGAAGGU (SEQ ID NO:104)
hsa-miR-320e (miR maduro)	AAAGCUGGGUUGAGAAGG (SEQ ID NO:105)
hsa-miR-324 (pre-miR)	CUGACUAUGCCUCCCCGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGUAAAGC UGGAGACCCACUGCCCCAGGUGCUGCUGGGGGUUGUAGUC (SEQ ID NO:106)
hsa-miR-324 (brazo 5' miR maduro)	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU (SEQ ID NO:107)
hsa-miR-324 (brazo 3' miR maduro)	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG (SEQ ID NO:108)
hsa-miR-429 (pre-miR)	CGCCGGCCGAUGGGCGUCUUAACCAGACAUGGUUAGACCUGGCC CUCUGUCUAAUACUGUCUGGUAAAACCGUCCAUCCGCUGC (SEQ ID NO:109)
hsa-miR-429 (miR maduro)	UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU (SEQ ID NO:110)
hsa-miR-451a (pre-miR)	CUUGGGAAUGGCAAGGAAACCGUUACCAUUACUGAGUUUAGUA AUGGUAAUGGUUCUCUUGCUAUACCCAGA (SEQ ID NO:111)
hsa-miR-451a (miR maduro)	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU (SEQ ID NO:112)
hsa-miR-451b (pre-miR)	UGGGUAUAGCAAGAGAACCAUUACCAUUACUAAACUCAGUAAU GGUAACGGUUUCCUUGCCAUUCCCA (SEQ ID NO:113)
hsa-miR-451b (miR maduro)	UAGCAAGAGAACCAUUACCAUU (SEQ ID NO:114)
hsa-miR-486 (pre-miARN)	GCAUCCUGUACUGAGCUGCCCCGAGGCCCUUCAUGCUGCCCAG CUCGGGGCAGCUCAGUACAGGAUAC (SEQ ID NO:115)
hsa-miR-486-5p (brazo 5' miR maduro)	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG (SEQ ID NO:116)
hsa-miR-486-3p (brazo 3' miR maduro)	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU (SEQ ID NO:117)
hsa-miR-518e (pre-miR)	UCUCAGGCUGUGACCCUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUGUUGGCU AAAAGAAAAGAAAGCGCUUCCCUUCAGAGUGUUAACGCUUUGA GA (SEQ ID NO:118)
hsa-miR-518e 5p (brazo 5' miR maduro)	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUG (SEQ ID NO:119)
hsa-miR-518e-3p (brazo 3' miR maduro)	AAAGCGCUUCCCUUCAGAGUG (SEQ ID NO:120)

hsa-miR-660 (pre-miR)	CUGCUCCUUCUCCCAUACCCAUUGCAUAUCGGAGUUGUGAAUU CUCAAAACACCUCCUGUGUGCAUGGAUUACAGGAGGGUGAGCC UUGUCAUCGUG (SEQ ID NO:121)
hsa-miR-660-5p (brazo 5' miR maduro)	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUUG (SEQ ID NO:122)
hsa-miR-660-3p (brazo 3' miR maduro)	ACCUCCUGUGUGCAUGGAUUA (SEQ ID NO:123)

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no se deben interpretar como limitativos del alcance de la invención. En la medida en que se mencionan materiales específicos, tiene solamente efectos de ilustración y no pretende limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se refieren a la utilidad clínica de un clasificador de firma de microARN basado en plasma dentro de la detección de cáncer de pulmón por tomografía computarizada, también denominado Estudio de Ensayo de MILD Correlativo. Se proporcionan los resultados de un estudio de validación para determinar el rendimiento diagnóstico de un algoritmo clasificador de firma de miARN preespecificado (MSC) en 939 sujetos evaluados retrospectivamente en muestras recolectadas prospectivamente de sujetos fumadores dentro del ensayo clínico aleatorizado Detección de Pulmón Italiano Multicentro (MILD) de LDCT versus observación (Pastorino et al., 2012). Demostramos que MSC tiene un importante rendimiento diagnóstico y pronóstico.

Ejemplo 1: Métodos

A. Población de estudio. El ensayo de Detección de Pulmón Italiano Multicentro (MILD), un ensayo clínico prospectivo aleatorizado, se lanzó en 2005 y se inscribió en el Istituto Nazionale dei Tumori de Milán 4.099 fumadores actuales o anteriores, de al menos 50 años de edad y sin antecedentes de cáncer dentro de los cinco años: 2.376 (58%) se aleatorizaron a los brazos LDCT (LDCT 1190 anual, 1186 bienal) y 1.723 (42%) al brazo de observación (Pastorino et al., 2012). En el momento de la inscripción (línea de base) y de cada recordatorio anual o bienal de todos los voluntarios del ensayo, se recogió sangre completa como se describe (Boeri et al., 2011) de acuerdo con la Revisión interna y las Juntas de ética del Istituto Nazionale dei Tumori de Milán.

Para este estudio, se usaron 1,000 muestras de plasma consecutivas recolectadas entre junio de 2009 y julio de 2010 entre las personas sin cáncer de pulmón inscritas en el ensayo para determinar la especificidad del MSC. Las muestras de plasma se analizaron primero para determinar la hemólisis (ver a continuación) para extraer muestras de pacientes que estaban potencialmente contaminados por miARN de glóbulos rojos (Kirschner et al., 2011; Pritchard et al., 2012). De las 1000 muestras, 130 no fueron evaluables debido a la hemólisis. De los 870 sujetos restantes, 594 (68%) pertenecían a los brazos de LDCT y 276 (32%) al brazo de observación. Para obtener una cohorte para determinar el rendimiento de sensibilidad de MSC, se obtuvieron muestras de plasma de casi todos los pacientes con cáncer de pulmón diagnosticados en septiembre de 2012 (N=85). Preferimos medir el Valor Predictivo Negativo (NPV) en una gran serie de sujetos no seleccionados, en lugar de casos y controles coincidentes, lo que habría reducido en gran medida el número de controles y el poder del estudio. Para 69 de estos 85 pacientes, se recolectó al menos una muestra evaluable. Para todos los pacientes, consideramos que la muestra más cercana al examen LDCT resultó en el diagnóstico de cáncer. Específicamente, se dispuso de una muestra al diagnóstico para 50 pacientes y una muestra preenfermedad para 19 pacientes (Fig. 1). Las muestras preenfermedad se recogieron de 8 a 35 meses antes de la detección del cáncer de pulmón con un tiempo medio de retraso de 18 meses.

B. Perfil de MicroRNA. El ARN total se extrajo de muestras de plasma de 200 µl con mirVana PARISKit (Life Technologies, Ambion) y se eluyó en 50 µl de tampón. La expresión de miARN se determinó en 3 µl de ARN eluido utilizando el Multiplex Pools Protocol en una tarjeta microfluídica hecha a medida (Life Technologies, Applied Biosystems) que contiene los 24 miARN detectados en duplicados. Para cada muestra, se determinaron las Ct de los miARN individuales usando el software ViiA7 (Life Technologies, Applied Biosystems) con un umbral de 0.15 y una línea base automática. Para la entrada en el MSC, el promedio de las lecturas duplicadas de las relaciones de miARN predefinidas se calculó como se describió previamente (Boeri et al., 2011).

C. Análisis estadístico. Las puntuaciones de riesgo del MSC cegados al resultado clínico para los sujetos individuales se enviaron a un centro de investigación independiente, el Istituto Mario Negri de Milán, y el análisis de datos se completó según un plan de análisis estadístico preespecificado. Sensibilidad (SE), especificidad (SP), valor predictivo positivo (PPV) y valor predictivo negativo (NVP) del MSC se calcularon para evaluar el rendimiento discriminatorio de MSC para clasificar a los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón versus sujetos sin enfermedad en general y para tanto LDCT como los brazos observacionales del estudio. Para el rendimiento diagnóstico, los individuos categorizados dentro del grupo de bajo riesgo MSC se compararon con aquellos dentro de MSC-Intermedio o MSC-Alto. También calculamos SE y SP para el uso combinado de MSC binario y LDCT, considerando pruebas positivas únicas y positivas dobles.

Para tener en cuenta la dependencia temporal del MSC como predictor del desarrollo de la enfermedad, el SE, SP, PPV y NPV se calcularon para los diversos intervalos de tiempo desde la recogida de muestras de sangre hasta el diagnóstico de cáncer de pulmón (6, 12, 18 y 24 meses), usando la metodología descrita por Heagerty et al., *Biometrics* 56: 337-344 (2000) y Zheng y Heagerty, *Biometrics* 63: 332-341 (2007).

Para determinar el rendimiento pronóstico de MSC, se examinaron los tres grupos de riesgo y se obtuvo una curva de supervivencia como el estimador de Kaplan-Meier a partir de la fecha de recogida de muestras de sangre de acuerdo con MSC entre los 939 sujetos. Estimamos la heterogeneidad de MSC en la supervivencia utilizando modelos de riesgos proporcionales de Cox, considerando también modelos ajustados para la edad y el género y se calculó la prueba de χ^2 entre el MSC alto/intermedio bajo.

D. Evaluación de hemólisis que afecta a muestras de plasma. Las muestras de plasma con la presencia de hemólisis se eliminaron de los análisis posteriores porque la hemólisis de las células sanguíneas, como los glóbulos rojos (RBC) o las plaquetas, libera miARN contaminantes (Kirschner et al., 2011; Pritchard et al., 2012). Se usaron dos mediciones de control de calidad (QC) para esta evaluación. En primer lugar, en un paso preanalítico previo a la extracción de ARN, se realizó un análisis espectrofotométrico midiendo la absorbancia a diferentes longitudes de onda (414 nm, 541 nm, 576 nm) para identificar la presencia y cantidad de hemoglobina libre en la muestra (Kirschner et al. 2011).

Se implementó un segundo paso de QC para obtener una sensibilidad de hemólisis incluso mayor analizando los niveles de expresión de miARN relacionados con hemólisis contenidos en el clasificador de firma de miARN (MSC; mir-451, 486-5p, 16, 92a) para todas las muestras. Las muestras de plasma con niveles de expresión de miARN relacionados con hemólisis que excedieron 2 desviaciones estándar de la media global de todas las muestras se excluyeron de los análisis posteriores. Las muestras con hemólisis detectable espectrofotométricamente medida también se excluyeron en este segundo paso de control de calidad. No se observó ninguna diferencia en la frecuencia o en la cantidad de hemólisis medida espectrofotométricamente o por análisis de los miARN relacionados con la hemólisis en las muestras de cáncer frente a las de control.

Además del potencial de contaminación de miARN liberados por hemólisis, miARN expresado diferencialmente en plasma podría simplemente reflejar diferentes recuentos de células sanguíneas (Pritchard, 2012). Para analizar esta hipótesis, las relaciones de miARN compuestas por miARN expresados en neutrófilos y expresados en RBC (Id) se compararon con las relaciones entre los niveles de neutrófilos y RBC obtenidos por hemograma completo (CBC) de 23 pacientes con cáncer de pulmón de este presente estudio. Como se informa en la Tabla 3, no se encontró que ninguna de las relaciones de miARN presentes en las firmas tuviera una correlación significativa con las respectivas relaciones de CBC.

Tabla 3. Correlación de las relaciones de miARN en plasma con los recuentos de células sanguíneas en 23 pacientes con cáncer de pulmón. En la tabla se muestran los coeficientes de correlación de Pearson de las relaciones de neutrófilos frente a RBC miARN y neutrófilos frente a RBC en las 23 muestras. Se informaron correlaciones estadísticamente significativas (dos valores p de cola <0,05).

Relaciones de miARN neutrófilo/miARN RBC	Correlación Perason con recuentos celulares neutrófilos/RBC
197/16 ⁺	0.34
197/486-5p ⁺	0.20
197/451 ⁺	0.15
197/92a ⁺	-0.07
142-3p/16	0.16
142-3p/486-5p	0.01
142-3p/451	0.07
142-3p/92a	-0.10
140-5p/16	0.27
140-5p/486-5p	0.15
140-5p/451	0.13
140-5p/92a	-0.11
17/16 ⁺	0.19
17/486-5p ⁺	0.11
17/451 ⁺	0.10
17/92a ⁺	-0.19
21/16	0.43 [°]
21/486-5p	0.14
21/451	0.23

21/92a

0.06

+ Presente en las firmas descritas en este documento
 °Valor-p de dos colas para correlación de Pearson
 <0.05

La segunda etapa de QC que implica el análisis de miARN relacionados con hemólisis puede utilizar adicional o alternativamente una firma de miARN de hemólisis que comprende los miARN contenidos dentro del MSC como se describe en este documento.

5 i. Detección de hemólisis utilizando una firma de miARN: colección de plasma

10 Se recogieron muestras de sangre completa, con adición de EDTA, y se almacenaron a temperatura ambiente durante no más de 1-2 horas antes del procesamiento. Se debe evitar el almacenamiento a temperatura reducida, ya que puede conducir a la liberación inespecífica de miARN. Las muestras se centrifugaron a aproximadamente 1250 veces g a 4°C durante 10 minutos para separar el plasma, que se transfirió cuidadosamente mientras se evitaba el material más cercano al anillo linfocítico. El plasma se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y luego se separó en alícuotas, con la evitación de material sedimentado, que se almacenó a -80°C durante hasta 1 año o más.

15 ii. Niveles de expresión de miARN en muestras hemolizadas versus muestras no hemolizadas

20 Para desarrollar la firma de miARN para la detección de hemólisis, se hemolizaron 24 muestras de plasma. La hemólisis se evaluó mediante inspección visual. Las muestras hemolizadas se perfilaron para la expresión de un panel de miARN utilizando tarjetas microfluídicas hechas a medida. La expresión de los miARN en las muestras hemolizadas se comparó con la de las muestras no hemolizadas (basadas en la evaluación visual) de 98 individuos libres de enfermedad.

25 Se incluyeron cuatro miARN (miR-16, miR-451, miR-486-5p y miR-92a) en el desarrollo de la firma de miARN. Los valores de Ct en bruto (una medida del nivel de expresión) se muestran en la Tabla 4. Los 4 miARN, miR-16, miR-451, miR-486-5p y miR-92a, además de miR-140-3p, están significativamente regulados por aumento (p<0.001) en muestras hemolizadas versus muestras no hemolizadas.

Tabla 4. Valores de Ct en bruto para miARN en muestras hemolizadas frente a muestras no hemolizadas.

	NO HEMOLIZADO		HEMOLIZADO		valor-p	Δ
	Ct promedio	d.e.	Ct promedio	d.e.		
miR-101	30.0	1.5	28.8	1.8	0.007	1.2
miR-106a	20.5	1.4	19.9	1.6	0.092	0.6
miR-126	21.3	1.4	21.7	1.5	0.261	-0.4
miR-133a	30.0	1.8	30.8	2.4	0.132	-0.8
miR-140-3p	30.7	1.8	28.9	1.9	<0.001	1.8
miR-140-5p	25.8	1.3	25.8	1.6	0.862	-0.1
miR-142-3p	21.5	1.5	22.3	1.8	0.030	-0.9
miR-145	26.1	1.6	26.6	1.8	0.260	-0.5
miR-148a	28.9	1.5	28.6	1.5	0.486	0.2
miR-15b	24.9	1.5	25.0	1.6	0.823	-0.1
miR-16	20.7	1.5	18.3	2.2	<0.001	2.4
miR-17	20.6	1.4	20.0	1.6	0.078	0.7
miR-197	26.1	1.5	26.2	1.2	0.659	-0.1
miR-19b	21.5	1.5	20.4	1.8	0.006	1.2
miR-21	24.8	1.4	24.9	1.9	0.886	-0.1
miR-221	24.1	1.4	24.8	1.9	0.108	-0.7
miR-28-3p	26.4	1.5	26.8	1.4	0.256	-0.4
miR-30b	22.2	1.5	22.8	1.6	0.087	-0.6
miR-30c	24.0	1.6	24.3	1.6	0.294	-0.4
miR-320	23.1	1.4	22.6	1.4	0.107	0.5
miR-451	22.9	1.6	20.0	2.5	<0.001	2.9

ES 2 686 631 T3

miR-486-5p	23.5	1.6	20.6	2.2	<0.001	2.8
miR-660	29.2	1.5	27.8	2.1	0.004	1.5
miR-92a	24.0	1.4	22.8	1.5	<0.001	1.3

iii. Generación de relaciones de miARN en la firma para hemólisis

Para discriminar entre muestras hemolizadas versus no hemolizadas usando relaciones de miARN, se analizaron muestras de plasma normales que contenían diluciones en serie de una muestra de plasma hemolizada in vitro para los niveles de expresión de miARN. Las relaciones de varios miARN a cada uno de los cuatro miARN que se muestran en la Tabla 4 se calcularon para ser reguladas por incremento (miR-16, miR-451, miR-486-5p, y miR-92a). MiR-126, miR-15b, miR-221 y miR-30b, se identificaron como miARN cuyas relaciones con los cuatro miARN regulados por incremento tenían la mejor correlación con la hemólisis (Tabla 5).

Tabla 5. Relaciones de nivel de expresión de miARN en plasma que representa hemólisis in vitro

	Corte	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	No tratado
451/126	0.74	2.60	1.66	0.70	0.94	0.41	0.28	-0.53	-0.69	-0.78
451/15b	4.07	5.88	5.28	4.30	4.54	4.00	4.05	3.11	3.39	2.85
451/221	3.81	5.69	4.94	4.14	4.16	3.76	3.66	3.32	3.06	2.26
451/30b	1.53	2.73	2.15	1.25	1.12	0.85	0.50	-0.31	-0.01	-0.29
486-5p/126	-0.34	2.25	1.47	0.41	0.33	-0.11	-0.02	-0.27	-0.75	-1.00
486-5p/15b	3.33	5.51	5.09	4.01	3.93	3.48	3.75	3.38	3.33	2.63
486-5p/221	2.63	5.32	4.74	3.85	3.55	3.23	3.36	3.59	2.99	2.04
486-5p/30b	0.70	2.36	1.96	0.96	0.52	0.33	0.20	-0.05	-0.07	-0.51
92a/126	-1.86	-0.54	-1.09	-1.84	-1.84	-1.80	-1.93	-2.47	-2.77	-2.70
92a/15b	1.70	2.74	2.53	1.76	1.76	1.79	1.83	1.18	1.31	0.93
92a/221	1.08	2.55	2.18	1.60	1.38	1.55	1.45	1.39	0.97	0.34
92a/30b	-0.83	-0.41	-0.60	-1.29	-1.66	-1.36	-1.71	-2.24	-2.10	-2.22
16/126	1.92	5.15	4.05	3.54	3.50	3.00	3.26	2.91	2.42	1.79
16/15b	5.34	8.42	7.67	7.14	7.10	6.59	7.03	6.55	6.50	5.43
16/221	5.01	8.28	7.32	6.98	6.72	6.35	6.65	6.76	6.16	4.84
16/30b	2.75	5.28	4.54	4.09	3.68	3.44	3.49	3.13	3.10	2.28
Cortes que exceden relaciones		16	16	13	13	10	9	8	6	1
R414/375		2.48	2.02	1.80	1.61	1.49	1.44	1.45	1.39	1.34

Los valores se expresan como log₂ (relación)

Se calcularon las relaciones medias de miARN basales usando la fórmula, relación media +1.5 d.e. (desviación estándar), de muestras de plasma no hemolizadas de 98 individuos libres de enfermedad. Estas relaciones iniciales se establecieron como el punto de corte para cada una de las 16 relaciones de miARN en el desarrollo de la firma de miARN para la hemólisis.

iv. Uso de la firma de miARN de hemólisis para detectar hemólisis

La firma de miARN de hemólisis puede usarse para detectar hemólisis en muestras de plasma. La Tabla 6 muestra una lista de 16 relaciones compuestas de 8 miARN (miR-126, 15b, 30b, 221, 451, 16, 486-5p y 92a). En particular, los 4 miARN, miR-451, miR-486-5p, miR-16 y miR-92a, están todos sobreexpresados en muestras hemolizadas. Esta sobreexpresión puede usarse como un indicador de hemólisis en una muestra de plasma. Además, si 8, o más, de las 16 relaciones mostradas en la Tabla 6 exceden el valor de corte, entonces la muestra de plasma es positiva para la hemólisis.

Tabla 6. Firma de miARN para hemólisis

Relaciones de miARN	Corte (log ₂)
126/451	< -0.74

15b/451	< -4.07
221/451	< -3.81
30b/451	< -1.53
126/486	< 0.34
15b/486	< -3.33
221/486	< -2.63
30b/486	< -0.70
126/92a	< 1.86
15b/92a	< -1.70
221/92a	< -1.08
30b/92a	< 0.83
126/16	< -1.92
15b/16	< -5.34
221/16	< -5.01
30b/16	< -2.75

v. Comparación de la firma de miARN de hemólisis con los métodos de absorbancia de hemoglobina para detectar hemólisis

5 Se sabe en la técnica que la hemoglobina tiene una longitud de onda de absorbancia a 414 nm. Un método estándar usado tanto en la práctica científica como clínica para analizar la hemólisis es la medición espectroscópica a la longitud de onda de 414 nm (usando un umbral de absorbancia de 0.2) de hemoglobina libre en muestras de plasma. En este experimento, la absorbancia a 414 nm se normalizó frente a la absorbancia a 375 nm para superar la señal de fondo alta en algunas muestras (por ejemplo, en muestras lipémicas). Se estableció un corte de 1.4 para la relación de absorbancia a 414 nm a absorbancia a 375 nm.

10 Como se muestra en la última fila de la Tabla 5, las muestras con un valor de A414nm/A375nm mayor que 1.40 se correspondieron con la firma de miARN en la que al menos 8 de 16 relaciones de miARN excedieron sus respectivos valores de corte. Estos ajustes se usaron para evaluar el poder de la firma de miARN para distinguir las 24 muestras de plasma hemolizadas de 98 no hemolizadas (basadas en la inspección visual). El método de firma de miARN mostró una sensibilidad de 0.88 y una especificidad de 0.93. Con respecto a la sensibilidad, estaba claro que las 24 muestras que se evaluaron visualmente para ser hemolizadas se hemolizaron.

15 Se compararon los métodos de firma y espectrofotometría de miARN de hemólisis usando una serie independiente compuesta por una selección de 60 muestras de plasma que se hemolizaron visualmente (rojo, naranja o amarillo oscuro) y 43 muestras de plasma no hemolizadas basándose en la inspección visual. Con respecto a la sensibilidad (Tabla 7), las 5 muestras más hemolizadas (rojas) fueron reconocidas como positivas para la hemólisis por ambos métodos. Sin embargo, al evaluar las muestras de naranja y amarillo oscuro, el método de firma de miARN fue más sensible (>90% versus 76% para el método espectrofotométrico).

20 Tabla 7. Comparación de los resultados del espectrofotómetro y los miARN para evaluar la hemólisis en 60 muestras de plasma hemolizadas visualmente.

	Rojo	Naranja	Amarillo oscuro
Total	5	25	30
R 414/375	5(100.0)	19(76.0)	23(76.7)
miARN	5(100.0)	23(92.0)	29(96.7)
Concordancia	5(100.0)	21(84.0)	22(73.3)

() porcentajes del total que fueron detectados por cada método como siendo hemolizados

30 Por otro lado, en las 43 muestras de plasma que no se hemolizaron en base a la inspección visual (Tabla 8), los resultados mostraron que 3 (7%) muestras fueron positivas para hemólisis usando ambos métodos, 1 (2%) muestra fue positivo solo en el método espectrofotométrico, y 2 (5%) muestras fueron positivas solo en el método de firma de miARN. Cuarenta (93%) muestras tenían un acuerdo en la clasificación de hemólisis entre los dos métodos. Excluyendo los 3 casos positivos en ambos métodos, el método espectrofotométrico tenía 97.5% de especificidad y el método de firma de miARN tenía 95% de especificidad.

Tabla 8. Comparación de los resultados del espectrofotómetro y los miARN para evaluar la hemólisis en 43 muestras de plasma no hemolizadas (basadas en inspección visual).

R414/375 \ miARN	Positivo	Negativo	Tot
Positivo	3(7.0)	1(2.3)	4(9.3)
Negativo	2(4.7)	37(86.0)	39(90.7)
Tot	5(11.6)	38(88.4)	40(93.0)

5 () porcentajes del total; Kappa estadístico = 0.63

10 E. Algoritmo del clasificador de firmas miARN (MSC). El algoritmo MSC es como se describe en detalle en el presente documento. Para el desarrollo de este algoritmo, se generaron diferentes relaciones de expresión génica de 24 miARN diferentes a partir de 4.950 relaciones de 100 miARN (estables) que circulan en el plasma en un conjunto de muestras de pacientes con cáncer de pulmón recolectadas prospectivamente antes o al momento del diagnóstico del ensayo de detección del cáncer de pulmón INT/IEO como se describió previamente (Boeri et al., 2011). El desarrollo del algoritmo MSC preespecificado utilizado en este estudio se perfeccionó a partir de ese estudio previo de dos maneras.

15 Primero, las muestras con hemólisis detectable se eliminaron del conjunto de entrenamiento original (Boeri et al., 2011). Posteriormente a esa publicación, los investigadores informaron que la hemólisis afectaba las mediciones de expresión precisa de miARN en muestras de plasma y suero. Por lo tanto, para generar un conjunto de entrenamiento óptimo para MSC, se excluyeron 5 muestras dentro del conjunto de entrenamiento original debido a hemoglobina detectable mediante análisis espectrofotométrico y aumento en los niveles de miARN relacionados con la hemólisis (como se describe en este documento). Las relaciones de miARN se usaron en el conjunto de entrenamiento óptimo para desarrollar las firmas de miARN para el Riesgo de Enfermedad (RD), Presencia de Enfermedad (PD), Riesgo de Enfermedad Agresiva (RAD) y Presencia de Enfermedad Agresiva (PAD; Tabla 9).

Tabla 9. Firmas de relaciones de miARN refinadas y valores de corte correspondientes (log₂).

RD	Corte	RAD	Corte	PD	Corte	PAD	Corte
197/660	> 4.30	197/451	> -1.75	106a/142-3p	> 2.02	197/486-5p	> -1.39
17/660	> 9.26	28-3p/451	> -2.41	106a/140-5p	> 5.50	197/451	> -1.75
28-3p/660	> 3.36	320/451	> 1.00	106a/660	> 9.32	197/660	> 4.30
133a/660	> 0.59	126/451	> 2.85	106a/92a	> 3.97	17/486-5p	> 3.75
106a/660	> 9.32	197/92a	> -1.28	142-3p/17	< -1.95	17/451	> 3.33
197/451	> -1.88	28-3p/92a	> -1.81	140-5p/17	< -5.58	17/660	> 9.26
17/451	> 3.33	320/92a	> 1.65	17/660	> 9.26	106a/486-5p	> 3.75
28-3p/451	> -2.49	126/92a	> 3.39	17/92a	> 3.81	106a/451	> 3.33
133a/451	> -5.49	142-3p/197	< 3.25	142-3p/197	< 3.25	106a/660	> 9.32
19b/660	> 8.38	142-3p/28-3p	< 3.75	140-5p/197	< -0.34	126/486-5p	> 2.55
197/19b	> -4.12	126/142-3p	> 0.81	197/660	> 4.30	126/451	> 2.85
142-3p/15b	< 2.88	19b/451	> 2.85	142-3p/28-3p	< 3.75	126/660	> 8.55
15b/660	> 5.00	197/660	> 4.30	140-5p/28-3p	< 0.26	16/197	< 5.00
320/660	> 6.77	197/30c	> -1.41	28-3p/660	> 3.36	140-5p/197	< -0.34
126/660	> 8.55	197/21	> -0.40	126/142-3p	> 0.81	197/92a	> -1.28
140-3p/660	> -0.21	17/451	> 3.33	126/140-5p	> 4.76	197/30b	> -3.24
16/197	< 5.00	106a/451	> 3.33	126/660	> 8.55	197/30c	> -1.41
197/92a	> -1.28	197/30b	> -3.24	142-3p/145	< 3.62	19b/660	> 8.38
17/92a	> 3.81	106a/142-3p	> 2.02	320/660	> 6.77	28-3p/486-5p	> -2.40
133a/92a	> -4.18	142-3p/17	< -1.95	142-3p/15b	< 2.88	28-3p/451	> -2.41
101/140-3p	< -0.20	21/28-3p	< 0.70	19b/660	> 8.38	16/17	< -0.50
15b/30c	> -0.67	126/21	> 3.98	142-3p/148a	< 6.21	106a/16	> 0.55
106a/92a	> 3.97	197/19b	> -4.10	197/92a	> -1.28	19b/486-5p	> 2.85
15b/30b	> -2.47	28-3p/660	> 3.36	142-3p/30b	< -0.40	19b/451	> 2.85
15b/21	> 0.36	21/221	< -1.35	142-3p/21	< 2.62	320/486-5p	> 1.40
106a/451	> 3.33	145/197	< -1.10	142-3p/221	< 1.69	320/451	> 1.00
15b/451	> -0.90	28-3p/30c	> -1.99	133a/142-3p	> -7.20	320/660	> 6.77

28-3p/30b > -3.60 16/320 < 1.71

RD: Riesgo de enfermedad; RAD: riesgo de enfermedad agresiva; PD: presencia de enfermedad; PAD: presencia de una enfermedad agresiva. Los valores de corte de relación se establecieron para muestras de plasma almacenadas a -80°C durante al menos 1 y hasta 5 años.

- 5 La segunda forma en que el desarrollo del algoritmo MSC difirió en este estudio del estudio anterior es que se generaron valores de corte de relación predefinidos para obtener una especificidad de $\geq 80\%$ utilizando muestras de plasma de un conjunto de entrenamiento de 84 personas libres de enfermedad del ensayo MILD que no se incluyeron en la cohorte de validación de 939 sujetos.
- 10 El uso de muestras de plasma de sujetos individuales, en lugar de grupos (utilizados en Boeri et al., 2011), nos permitió considerar todos los 24 miARN identificados originalmente en el conjunto de entrenamiento y generar cortes precisos. Por lo tanto, el presente estudio podría incluir mir-101, 145 y 133a, que se excluyeron en el primer conjunto de validación debido a una alta variabilidad entre los sujetos dentro de los grupos de control utilizados en ese estudio.
- 15 Para construir una categorización de riesgo de tres niveles para la enfermedad (MSC bajo, intermedio y alto), el conjunto de entrenamiento también se usó para establecer el número mínimo de relaciones que excedía el valor de corte respectivo necesario para ser considerado positivo: 10/27 para RD, 9/27 para PD, 14/28 para RAD, 14/28 para PAD. El MSC de tres niveles se definió a continuación: Bajo riesgo (L) si $RD^{neg} \cap PD^{neg} \cap RAD^{neg} \cap PAD^{neg}$; Riesgo intermedio (I) si $RD^{pos} \cup PD^{pos} \cap RAD^{neg} \cap PAD^{neg}$; o Alto riesgo (H) si $RAD^{pos} \cup PAD^{pos}$. Estos grupos de riesgo preespecificados se usaron luego para evaluar el rendimiento diagnóstico y pronóstico dentro de un conjunto independiente de 939 sujetos del ensayo de detección MILD.

25 F. Características de los sujetos. Las características de 939 sujetos con muestras de plasma evaluables inscritas en el ensayo MILD (2005-2012, LDCT: N = 652; Observación: N = 287), que incluyen 69 pacientes con cáncer de pulmón y 870 sujetos sin cáncer de pulmón, se indican según la edad, sexo y tabaquismo, duración y cantidad de cigarrillos/día (Tabla 10). Los pacientes con cáncer de pulmón eran mayores que los pacientes sin cáncer de pulmón ($p < 0.0001$), y la proporción de hombres era más alta (81.2% frente al 63.3%, $p = 0.0029$). El estado de tabaquismo no fue significativamente diferente entre grupos con cáncer o sin ellos, pero los sujetos que desarrollaron cáncer habían fumado durante más tiempo ($p < 0.0001$).

30 Tabla 10. Distribución de 69 sujetos con cáncer de pulmón y 870 sujetos sin cáncer de pulmón según la edad, el sexo y el tabaquismo. El estudio de Detección Pulmonar Italiana Multicéntrica (MILD), 2005-2012.

	Cánceres de pulmón	Sin cáncer de pulmón	valor p*
Edad (años)			<0.0001
<55	13 (18.8)	377 (43.3)	
55-59	15 (21.7)	242 (27.8)	
60-64	23 (33.3)	165 (19.0)	
≥ 65	18 (26.1)	86 (9.9)	
<i>media (de)</i>	60.9 (6.3)	56.4 (5.8)	
<i>rango</i>	50-77	50-75	
Sexo			0.0029
femenino	13 (18.8)	319 (36.7)	
masculino	56 (81.2)	551 (63.3)	
Estado de fumador			0.9
exfumador	14 (20.3)	180 (20.7)	
Fumador actual	55 (79.7)	690 (79.3)	
Duración de tabaquismo (años)			<0.0001
<40	19 (27.5)	500 (57.5)	
40-49	41 (59.4)	326 (37.5)	
≥ 50	9 (13.1)	44 (5.1)	
Cigarrillos/día			0.1201
<20	14 (20.3)	235 (27.0)	
20-29	31 (44.9)	440 (50.6)	
30-39	11 (15.9)	96 (11.0)	
≥ 40	13 (18.8)	99 (11.4)	

() Porcentaje de sujetos en cada categoría en el número total de sujetos con o sin cáncer de pulmón.

*Estimado por prueba χ^2

5 Para pacientes con cáncer, el tiempo medio desde la aleatorización hasta el diagnóstico fue de 29 meses (rango 1-82), y el tiempo medio desde el muestreo de plasma hasta el diagnóstico fue de 2 meses (rango 0-35). En sujetos sin cáncer de pulmón, el tiempo medio desde la aleatorización hasta el muestreo de plasma fue de 44 meses (rango 0-58) y el tiempo medio desde el muestreo de plasma hasta el último seguimiento fue de 27 meses (rango 3-41).

Ejemplo 2: Desempeño diagnóstico y pronóstico de MSC

10 Se analizaron muestras de plasma evaluables obtenidas antes o en el momento del diagnóstico de 939 sujetos a través de LDCT y grupos de observación usando un ensayo basado en RT-PCR en tiempo real con un algoritmo MSC preespecificado de bajo, intermedio y alto riesgo de grupos de cáncer. Se examinaron los grupos de riesgo MSC para los 939 sujetos de acuerdo con la aparición de cáncer de pulmón, muerte por cáncer de pulmón y etapa tumoral (Tabla 11). MSC Intermedio y Alto clasificaron correctamente a 60 de 69 pacientes con cáncer de pulmón con 87% SE, 81% SP, 27% PPV y 99% NPV. De los 19 pacientes con cáncer de pulmón que murieron durante el seguimiento, 18 fueron positivos en la prueba MSC, con 95% SE, 81% SP, 10% PPV y 100% NPV. No se observaron muertes por causas distintas al cáncer de pulmón durante el seguimiento. El rendimiento diagnóstico comparativo de MSC para la detección de cáncer de pulmón dentro de los dos brazos fue similar con 88% SE, 80% SP, 31% PPV, 99% NPV y 82% SE, 83% SP, 16% PPV, 99% NPV para LDCT y Brazos observacionales respectivamente.

20 Tabla 11. Distribución de 69 sujetos con cáncer de pulmón y 870 sujetos sin cáncer de pulmón según la prevalencia de cáncer de pulmón, muerte por cáncer de pulmón y estadio de cáncer de pulmón y clasificador de firma de miARN (MSC), con sensibilidad correspondiente (SE), especificidad (SP) valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). El estudio de Detección Pulmonar Italiana Multicéntrica (MILD), 2005-2012.

	Total	MSC (riesgo de cáncer de pulmón)		
		Alto (H)	Intermedio (I)	Bajo (L)
Todos los sujetos	939	63(6.7)	159(16.9)	717(76.4)
Sin cáncer de pulmón	870	32(3.7)	130(14.9)	708(81.4)
Cáncer de pulmón	69	31(44.9)	29(42.0)	9(13.0)
desempeño*		SE=87%, SP=81%, PPV=27%, NPV=99%		
Muertes por cáncer de pulmón+	19	12(63.2)	6(31.6)	1(5.3) ^o
Cáncer de pulmón, etapa I [≠]	37	14(37.8)	19(51.4)	4(10.8)
Cáncer de pulmón, etapa II-III [≠]	12	5(41.7)	4(33.3)	3(25.0)
Cáncer de pulmón, etapa IV [≠]	19	11(57.9)	6(31.6)	2(10.5)

25 () Porcentajes de los sujetos con grupos de riesgo MSC (L, I y H) dentro del número total de sujetos para cada categoría. * SE, SP, PPV y NPV se calcularon combinando MSC preespecificado Alto e Intermedio versus Bajo riesgo.

+ P=0.0366, basado en la prueba de Cochran-Armitage para la tendencia en la proporción de muertes entre estratos de grupos de riesgo MSC entre sujetos con cáncer de pulmón.

^o muestra de plasma obtenida 30 meses antes de la detección de la enfermedad.

30 [≠] información del estadio del tumor no estaba disponible en un paciente. p=0.49 para asociación de MSC con estadio tumoral

35 En los tres grupos de riesgo MSC, se observó una tendencia significativa en la proporción de muerte por enfermedad con una proporción creciente de muertes por cáncer de pulmón asociadas con Bajo, Intermedio y Alto, respectivamente (p=0.0336). Los grupos de riesgo de MSC no se asociaron significativamente (p=0.40) con la etapa variable del tumor (I, II-III o IV, tabla 11).

40 No se observaron diferencias significativas entre los grupos de riesgo MSC y los subtipos histológicos ($\chi^2 = 1.60$, p=0.4485), y entre el adenocarcinoma y el carcinoma epidermoide ($\chi^2=0.55$, p=0.759). El análisis de dependencia temporal del rendimiento diagnóstico de MSC mostró valores similares de SE, SP, PPV y NPV a intervalos de 6, 12, 18 y 24 meses entre el muestreo de sangre y el diagnóstico de cáncer de pulmón (Tabla 12).

45 Tabla 12. Análisis de dependencia temporal del clasificador de firma de miARN (MSC), con sensibilidad (SE), especificidad (SP), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) calculado a los 6, 12, 18 y 24 meses desde muestreo de sangre para la detección de cáncer de pulmón.

Meses desde muestreo de sangre hasta detección de cáncer de pulmón	SE	SP	PPV	NPV
--	----	----	-----	-----

6	83%	80%	18%	99%
12	86%	81%	22%	99%
18	86%	81%	23%	99%
24	87%	81%	25%	99%

Ejemplo 3: Rendimiento de diagnóstico complementario de LDCT y MSC

5 Restringir el análisis al total de 652 sujetos en el grupo de LDCT, LDCT identificó 46 de 58 sujetos con cáncer de pulmón que carecían de 3 pacientes dentro de los 251 sujetos sin ganglio pulmonar detectado y 9 pacientes a causa de un cáncer de intervalo para un SE de 79% (Tabla 13). Los tres cánceres con “ganglio pulmonar” comprendían una lesión no sólida, una adenopatía mediastínica y un derrame pleural. Los grupos de riesgo binario preespecificados de MSC (considerando Alto e Intermedio versus Bajo) identificaron 40 de 46 cánceres detectados con LDCT, 8 de 9 cánceres de intervalo y los 3 sujetos con “ganglio no pulmonar”.

10 Tabla 13. Distribución de 939 sujetos según el clasificador de firma de miARN (MSC) y la tomografía computarizada de dosis baja (LDCT), mediante LDCT (incluidos los cánceres de pulmón detectados cribados y detectados sin cribado) y los grupos de observación. El estudio de Detección Pulmonar Italiana Multicéntrica (MILD), 2005-2012.

	TOTAL		Sin cáncer de pulmón				Cáncer de pulmón			
			MSC		Bajo		MSC		Bajo	
	General		Alto	Intermedio	General		Alto	Intermedio	Bajo	
Brazo LDCT	652	594	22	94	478	58	27	24	7	
LDCT detectado	643	594	22	94	478	49	22	21	6	
Sin ganglio	251	248	7	42	199	3	2	1	0	
Diámetro de ganglio (mm)										
≤ 5	231	231	12	33	186	0	0	0	0	
> 5 - ≤ 10	102	94	2	16	76	8	4	2	2	
> 10	59	21	1	3	17	38	16	18	4	
Intervalo de cáncer	9					9	5	3	1	
Brazo de observación	287	276	10	36	230	11	4	5	2	
TOTAL	939	870	32	130	708	69	31	29	9	

15 LDCT tenía un SP de 81% para el subgrupo clínicamente accionable de ganglios no calcificados >5 mm y una tasa de falsos positivos asociada de 19.4% (115/594) (Tabla 13). Cuando se consideraron sujetos doblemente positivos (LDCT y MSC), la tasa de falsos positivos disminuyó a 3.7% (22/594), con una disminución en SE (40/58, 69%). Por el contrario, considerando un sujeto positivo con al menos una prueba positiva (LDCT o MSC), el uso combinado de LDCT y MSC identificó 57 de 58 casos, con un SE del 98% y un SP del 65%. Por otro lado, MSC detectó 9 de 11 (82%) cánceres de pulmón que ocurrieron en el brazo de observación (Tabla 13).

Ejemplo 4: Asociación de grupos de riesgo MSC con supervivencia

25 Se completó el análisis para determinar el rendimiento pronóstico de los tres grupos de riesgo MSC predefinidos para predecir la supervivencia global a partir de muestras de plasma recogidas para todos los sujetos con un seguimiento de tres años (N=939). La supervivencia a dos años fue del 100% para sujetos con MSC bajo, 98% para MSC intermedio y 87% para MSC alto, mientras que la supervivencia a tres años fue 100%, 97% y 77% para Bajo, Intermedio y Alto respectivamente (Figura 2) La diferencia en la supervivencia entre alto/intermedio y bajo MSC fue estadísticamente significativa ($\chi^2=49.53$, $P<0.0001$). La heterogeneidad fue aún significativa después del ajuste por edad y sexo ($\chi^2=12.57$, $P=0.0004$).

Ejemplo 5: Análisis

La característica de diagnóstico de alta sensibilidad acoplada con un NPV del 99% indica que el MSC es una prueba de detección clínicamente validada. Por otra parte, el rendimiento de diagnóstico de MSC como un predictor de desarrollo de cáncer de pulmón fue confirmado por el tiempo de análisis de dependencia.

5 MSC identificó sujetos con una alta probabilidad de muerte por enfermedad. Como un diagnóstico binario, MSC tuvo un SE de 95% y NPV de 100% para la muerte por enfermedad en 939 sujetos en ambos grupos. Además, los grupos de riesgo MSC se asociaron con una supervivencia significativamente diferente a los 3 años para toda la cohorte de 939 sujetos (100%, 97% y 77% para el MSC bajo, intermedio y alto, respectivamente). Estos hallazgos demuestran que los miARN en plasma identifican malignidad y agresividad del tumor.

10 Tres pequeños ensayos aleatorizados europeos, incluido MILD, han informado hasta la fecha reducciones de mortalidad no significativas (Infante et al., 2009; Saghir et al., 2012; Pastorino et al., 2012). El National Lung Screening Trial (NSLT), un ensayo aleatorizado de selección clínica que enlistó a 53.454 personas con 3 rondas de detección anual de LDCT frente a radiografías de tórax, demostró una reducción del 20% de la mortalidad por cáncer de pulmón (Aberle et al., 2011). Después de 3 rondas de detección, el 24,2% de los sujetos se clasificaron como positivos, con un 96,4% de estos siendo un falso positivo con la necesidad de seleccionar 320 sujetos para prevenir 1 muerte por cáncer de pulmón.

20 En una revisión sistemática de todos los ensayos clínicos aleatorizados que examinaron los beneficios y daños de la detección de LDCT, la tasa promedio de detección de ganglios fue del 20%, con un 90% de ganglios benignos (Bach et al., JAMA 307: 2418-2429, 2012). En este estudio, MSC clasificó el 74% (485) como Bajo riesgo entre los 652 individuos en el grupo LDCT: 478 fueron verdaderos negativos y 7 fueron falsos negativos. MSC pudo identificar 8 de 9 cánceres de intervalo no detectados por LDCT. Por lo tanto, la integración de MSC y LDCT (al menos una prueba positiva) aumentaría la sensibilidad de detección del 87% para MSC y 84% para LDCT solo, a 98% (57/58), con una tasa de falsos positivos de 35%. Por el contrario, considerando temas doble positivos (MSC y LDCT positivo), la integración de MSC con LDCT reduciría la tasa de falsos positivos de detección de LDCT más de 5 veces. Específicamente, la frecuencia de doble falsos positivos MSC y LDCT fue de solo 3.7% (22/594) en comparación con 19.7% (115/594) de LDCT solo, reduciendo sin embargo SE a 69%.

30 En consecuencia, MSC podría complementar la detección de LDCT reduciendo los resultados falsos positivos y permitir una mayor estandarización de los algoritmos de diagnóstico, disminuyendo así los costes de asistencia sanitaria. Además, se podrían proponer más repeticiones de MSC en lugar de LDCT para individuos con un MSC bajo, dada la ausencia de mortalidad a los tres años para sujetos con bajo MSC. El presente estudio ciego de un ensayo preespecificado basado en plasma representa el estudio más grande que prueba un biomarcador dentro de un ensayo de detección LDCT y demuestra el rendimiento diagnóstico superior de LDCT si se combina con MSC.

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia de un tumor pulmonar en un sujeto, el método comprende:
- 5 (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;
- (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;
- 10 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);
- 15 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos nueve relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 27 pares de miARN a menos de nueve relaciones de expresión de par de miARN se les asigna una puntuación positiva,
- 20 donde los pares de miARN comprenden uno o más o cada uno de 106a/140-5p, 106a/142-3p, 126/140-5p, 126/142-3p, 133a/142-3p, 140-5p/17, 142-3p/148a, 142-3p/15b, 142-3p/17, 142-3p/21, 142-3p/221, 142-3p/30b y 320/660, o las relaciones inversas de los mismos; y
- (e) categorizar la presencia de un tumor pulmonar como (i) positiva si al menos nueve de las relaciones de expresión del par de miARN tienen asignada una puntuación positiva, o (ii) negativa si se asignan puntuaciones positivas a menos de nueve relaciones de expresión de pares de miARN.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que los pares de miARN comprenden además uno o más o cada uno de 106a/660, 106a/92a, 126/660, 140-5p/197, 140-5p/28-3p, 142-3p/145, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 17/660, 17/92a, 197/660, 197/92a, 19b/660 y 28-3p/660, o sus relaciones inversas.
- 30 3. Un método para determinar la presencia de un tumor pulmonar agresivo en un sujeto que comprende:
- (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;
- (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;
- 35 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);
- 40 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 28 pares de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN,
- 45 donde los pares de miARN comprenden uno o más o cada uno de 106a/16, 106/660, 16/17, 16/320, 17/660, 197/30b, 197/30c, 320/451, 320/486-5p, y 320/660, o sus relaciones inversas; y
- (e) categorizar la presencia de un tumor pulmonar agresivo como (i) positivo si al menos catorce de las relaciones de expresión del par de miARN se les asigna una puntuación positiva, o (ii) negativo si se les asigna una puntuación de expresión positivo a menos de catorce pares de miARN.
- 50 4. El método de la reivindicación 3, donde los pares de miARN comprenden además uno o más o cada uno de 106a/451, 106a/486-5p, 126/451, 126/486-5p, 126/660, 140-5p/197, 16/197, 17/451, 17/486-5p, 197/451, 197/486-5p, 197/660, 197/92a, 19b/451, 19b/486-5p, 19b/660, 28-3p/451 y 28-3p/486-5p, o las relaciones inversas de los mismos.
- 55 5. Un método para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar en un sujeto, el método comprende:
- (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;
- 60 (b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;
- (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);
- 65

(d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos diez relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 27 de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de diez relaciones de expresión de pares de miARN,

5 donde los pares de miARN comprenden uno o más o cada uno de 133a/92a, 15b/21, 15b/30b, 15b/30c, 16/197 y 28-3p/451, o las relaciones inversas de los mismos; y

10 (e) categorizar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar como (i) positivo si al menos diez relaciones de expresión de pares de miARN tienen una puntuación positiva, o (ii) negativo si se asignan puntuaciones positivas a menos de diez relaciones de expresión de miARN.

15 6. El método de la reivindicación 5, en el que los pares de miARN comprenden además uno o más o cada uno de 101/140-3p, 106a/451, 106a/660, 106a/92a, 126/660, 133a/451, 133a/660, 140-3p/660, 142-3p/15b, 15b/451, 15b/660, 17/451, 17/660, 17/92a, 197/19b, 197/451, 197/660, 197/92a, 19b/660, 28-3p/660 y 320/660, o las relaciones inversas de los mismos.

7. Un método para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo en un sujeto, el método comprende:

20 (a) determinar la relación de expresión de un par de miARN en una muestra biológica del sujeto;

(b) comparar la relación de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado a partir de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;

25 (c) asignar una puntuación positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b), o asignar una puntuación no positiva para la relación de expresión del par de miARN en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b);

30 (d) repetir las etapas (a) hasta (c) para pares de miARN adicionales hasta que (1) al menos catorce relaciones de expresión del par de miARN tengan una puntuación positiva, o (2) después de la comparación de las relaciones de expresión de 28 pares de miARN se les asigna una puntuación positiva de menos de catorce relaciones de expresión de pares de miARN,

en la que los pares de miARN comprenden uno o más o cada uno de 106a/142-3p, 126/142-3p, 126/21, 126/92a, 142-3p/17, 142-3p/197, 142-3p/28-3p, 197/19b, 197/660 y 28-3p/660, o las relaciones inversas de los mismos; y

35 (e) categorizar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo como (i) positivo si al menos catorce pares de expresión de miARN se les asigna una puntuación positiva, o (ii) negativo si se asignan puntuaciones positivas a menos de catorce pares de miARN.

40 8. El método de la reivindicación 7, donde los pares de miARN comprenden además uno o más o cada uno de 106a/451, 126/451, 145/197, 17/451, 197/21, 197/30b, 197/30c, 197/451, 197/92a, 19b/451, 21/221, 21/28-3p, 28-3p/30b, 28-3p/30c, 28-3p/451, 28-3p/92a, 320/451 y 320/92a, o las razones inversas de los mismos.

9. Un método para predecir el riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar en un sujeto que comprende:

45 (a) determinar la presencia de una firma de tumor pulmonar de la reivindicación 1;

(b) determinar la presencia de una firma agresiva de tumor pulmonar de la reivindicación 3;

50 (c) determinar el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar de la reivindicación 5;

(d) determinar el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar agresivo de la reivindicación 7;

55 (e) categorizar al sujeto como de bajo riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar si ninguna de las firmas de las etapas (a)-(d) se categoriza como positiva;

(f) categorizar al sujeto como que tiene un riesgo intermedio de desarrollar o tener un tumor pulmonar si al menos la presencia de una firma de tumor pulmonar de la etapa (a) es positiva, o el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar de la etapa (c) es positiva; y tanto la presencia de una firma de tumor pulmonar agresivo de la etapa (b) como el riesgo de manifestar una firma de tumor pulmonar agresivo de la etapa (d) son negativos; y

60 (g) categorizar al sujeto como alto riesgo de desarrollar o tener un tumor pulmonar si al menos la presencia de una firma tumoral pulmonar agresiva de la etapa (b) es positiva o si el riesgo de manifestar una firma tumoral pulmonar agresiva de la etapa (d) es positivo.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 o 7, en el que el valor de corte se determina como la relación media de la pluralidad de muestras de control, la relación media de la pluralidad de muestras de control +/- una desviación estándar o la relación mediana de una pluralidad de muestras de control.
- 5 11. El método de la reivindicación 1, 3, 5 o 7, donde la relación de expresión del par de miARN se determina haciendo copias de ADNc de cada miARN en cada par de miARN usando la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR), preferiblemente usando tiempo real PCR, más preferiblemente usando sondas TaqMan.
- 10 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 o 7, en el que la muestra biológica es un fluido biológico preferiblemente seleccionado de orina, sangre, plasma o suero, más preferiblemente plasma o suero.
13. El método de la reivindicación 12, en el que cuando la muestra biológica es plasma o suero, se determina la hemólisis en la muestra biológica y la muestra no se somete al método si está presente una hemólisis detectable.
- 15 14. El método de la reivindicación 13, en el que la hemólisis se determina espectrofotométricamente o analizando niveles de expresión de miARN relacionados con hemólisis que están regulan por aumento en muestras hemolizadas o ambas.
- 20 15. El método de la reivindicación 14, en el que los miARN relacionados con la hemólisis comprenden una pluralidad de los miARN miR-451, miR486-5p, miR-16, miR-92a o miR-140-3p o en los que los miARN relacionados con la hemólisis son miR -451, miR-486-5p, miR16 y miR-92a.
- 25 16. El método de la reivindicación 14, que comprende además determinar niveles de expresión de una pluralidad de miARN normalizadores que no se regulan por aumento en muestras hemolizadas, para normalizar los niveles de expresión de los miARN relacionados con hemólisis, opcionalmente en los que los miARN normalizantes comprenden miR-126, miR -15b, miR-221 y miR-30b, opcionalmente en donde la hemólisis se determina adicionalmente al
- (a) determinar la relación de expresión de cada uno de 16 pares de miARN que consiste en cada uno de miR-451, miR-486-5p, miR-16 y miR-92a emparejados con cada uno de miR-126, miR-15b, miR-221 y miR-30b en la muestra;
- 30 (b) comparar cada una de las 16 relaciones de expresión de la etapa (a) con un valor de corte determinado para cada relación de expresión de la relación promedio de una pluralidad de pares de miARN correspondientes de una pluralidad de muestras de control;
- 35 (c) para cada uno de los 16 pares de miARN, asigne una puntuación positiva para la relación de expresión en la etapa (a) si la relación excede el valor de corte en la etapa (b) o asigne una puntuación no positiva para la relación de expresión en la etapa (a) si la relación no excede el valor de corte en la etapa (b); y
- 40 (d) categorizar la muestra como (i) que tiene hemólisis si ocho o más de las 16 relaciones excede el valor de corte, o (ii) no tener hemólisis si menos de ocho de las 16 relaciones excede el valor de corte.
- 45 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 o 7, que comprende adicionalmente cribar al sujeto para cáncer de pulmón usando un sistema que no comprende el análisis de expresión de miARN, antes de, o concurrentemente con análisis de expresión de miARN, opcionalmente en el que el sistema comprende un análisis de sangre, una radiografía, tomografía computarizada, tomografía por emisión de positrones, toracocentesis, broncoscopia, aspiración con aguja fina, toracoscopia, toracotomía, mediastinoscopia, preferiblemente tomografía computarizada de dosis baja (LDCT).
- 50 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 o 7, donde el método se realiza en al menos dos muestras biológicas diferentes del sujeto, preferiblemente en donde al menos una de las al menos dos muestras biológicas diferentes se toma del sujeto después de que el sujeto haya sido tratado por cáncer de pulmón.
- 55 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5, 7 o 9, en el que el sujeto no se trata para cáncer de pulmón si se determina una presencia o riesgo negativo, o si se determina un riesgo bajo; o el sujeto es tratado por cáncer de pulmón si se determina una presencia o riesgo positivo, o si se determina un riesgo intermedio o alto.

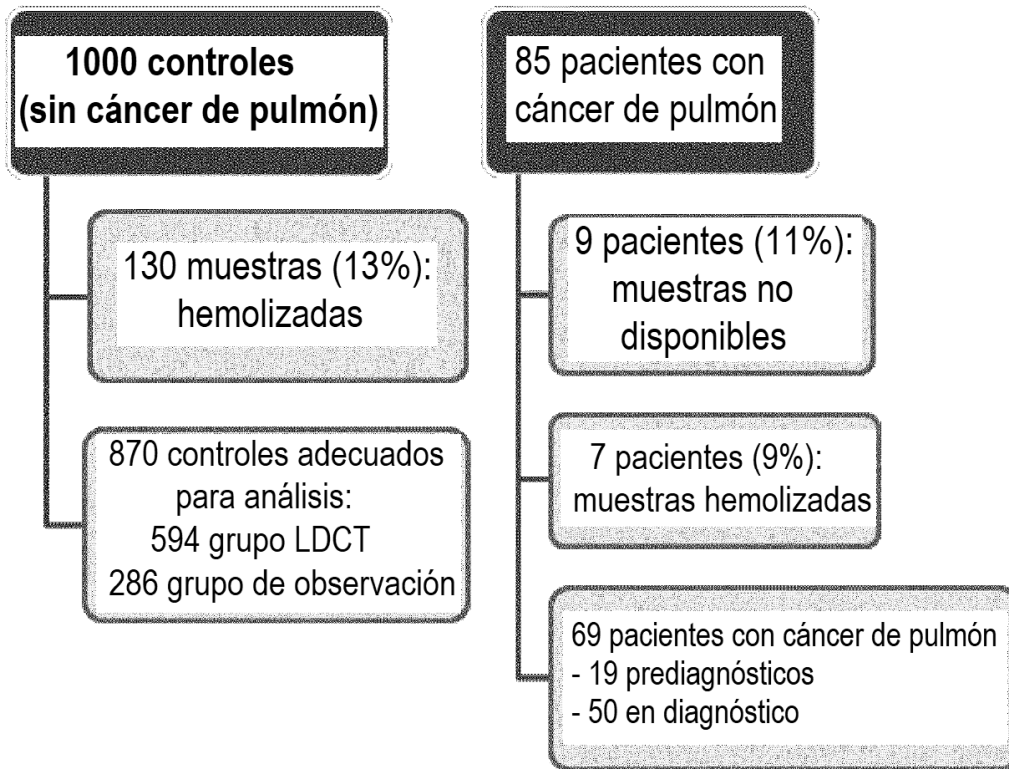
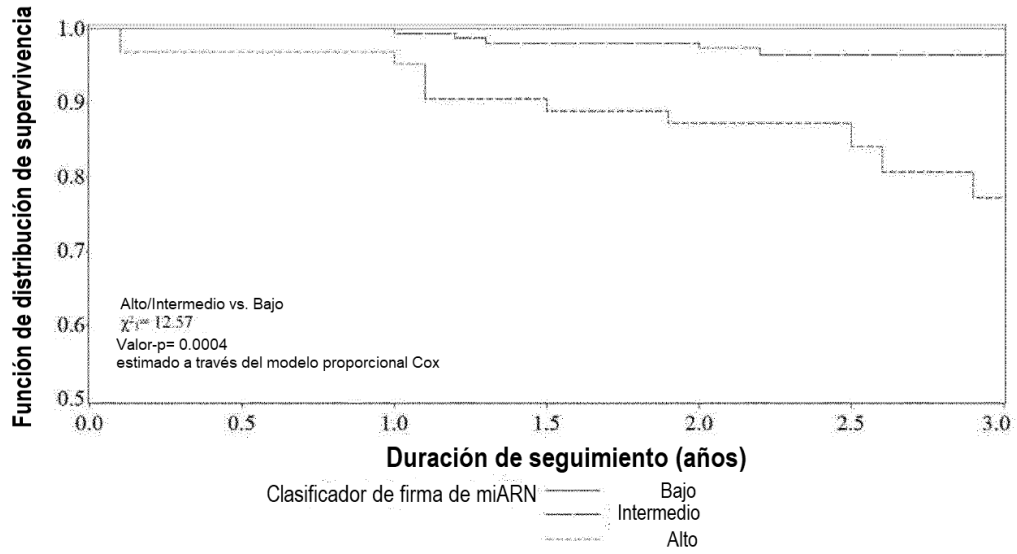


FIG. 1



Firma miARN		Tiempo			
		Valor inicial	1 año	2 años	3 años
Alto	Eventos*	0	2	8	11
	Número en riesgo	63	61	53	22
Intermedio	Eventos*	0	0	3	5
	Número en riesgo	159	156	149	39
Bajo	Eventos*	0	0	0	0
	Número en riesgo	717	715	710	83

FIG. 2