

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 144**

21 Número de solicitud: 201730739

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.05.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.11.2018

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (75.0%)
Av. de los Reyes Católicos 2
28040 Madrid ES;
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED (CIBER) (5.0%);
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA
PAZ (10.0%) y
FUNDACIÓN CONCHITA RÁBAGO DE JIMÉNEZ
DÍAZ (10.0%)**

72 Inventor/es:

**DEL POZO ABEJÓN, Victoria ;
SASTRE DOMINGUEZ, Joaquín;
RODRIGO-MUÑOZ, José Manuel ;
SASTRE TURRIÓN, Beatriz ;
QUIRCE GANCEDO, Santiago y
CAÑAS MAÑAS, José Antonio**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **MÉTODO IN VITRO PARA IDENTIFICAR ESCALONES DE GRAVEDAD EN PACIENTES CON ASMA BRONQUIAL**

57 Resumen:

La presente invención muestra que miR-185-5p presenta niveles superiores de expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct \text{ miARN de interés (miR-185-5p)} - Ct \text{ miARN endógeno}$) en los pacientes asmáticos comparados con los individuos sanos. Además, los niveles de expresión de miR-185-5p no sólo son diferentes entre sanos y asmáticos, sino entre sanos y cada uno de los subgrupos de asmáticos (intermitentes, persistentes leves, moderados y graves). Los resultados muestran además que los últimos dos escalones de gravedad, los persistentes moderados y graves presentan un escalonamiento o aumento progresivo de su expresión en comparación con intermitentes y persistentes leves.

ES 2 692 144 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO *IN VITRO* PARA IDENTIFICAR ESCALONES DE GRAVEDAD EN PACIENTES CON ASMA BRONQUIAL**Campo de la invención**

5

La presente invención puede incluirse en el campo de la medicina personalizada, en la que se usan biomarcadores específicos para identificar una enfermedad o trastorno dado. Específicamente, en la presente invención se usan algunos microARN (también denominados miARN o miR-) para identificar sujetos humanos con riesgo de desarrollar
10 asma bronquial, tanto de tipo alérgico como no alérgico, así como para identificar distintos escalones de gravedad en pacientes con asma bronquial.

Antecedentes de la invención

15 Uno de los biomarcadores más prometedores y con mayor proyección para su aplicación en la clínica son los microARNs. Los microARNs (miARNs) son secuencias de ARN no codificante de 19-22 nucleótidos de tamaño, que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Los miARNs se unen al mRNA por complementariedad de bases, inhibiendo la traducción de los mARNs reconocidos. Un mismo miARN puede regular muchos genes
20 mediante su unión complementaria a distintas regiones no traducidas 3' (*untranslated regions* o UTRs) de mARNs, estimándose que miles de genes humanos son dianas de distintos miARNs. Numerosos estudios muestran el efecto de los miARNs en distintas patologías de tipo Th2, como son el asma, la esofagitis eosinofílica, la rinitis alérgica y la dermatitis atópica, observándose que los miARNs regulan numerosos genes implicados en
25 estas patologías: miR-21 e interleucina (IL)-12, miR-126 con IL-5 e IL-13 y Let-7 con IL-13.

Los miARNs que se obtienen de muestras de suero o plasma son muy resistentes a la acción de ARNasas, a la temperatura y a otras condiciones extremas, haciendo de ellos unos biomarcadores muy prometedores para diferentes enfermedades como el cáncer.

30

Desde el primer estudio que caracterizó que el miR-21 podía ser utilizado como biomarcador en el linfoma de células B, el campo de estudio de los miARNs como biomarcadores ha ido evolucionando exponencialmente en los últimos años.

Así, un estudio de Solberg, O. D. et al. Airway Epithelial miRNA Expression Is Altered in Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 965–974 (2012), muestra que los perfiles de expresión de miARNs entre pacientes asmáticos y controles sanos varían en el epitelio respiratorio y en exosomas de lavado broncoalveolar (BAL). También se ha caracterizado la expresión de miARNs en linfocitos de pacientes asmáticos pediátricos comparados con sanos.

Otros grupos estudiaron expresión en células específicas de sanos y asmáticos, viendo diferencias en el miR-140 en células musculares lisas, o miR-223 y miR-146b en macrófagos, Jardim, M. J., Dailey, L., Silbajoris, R. & Diaz-Sanchez, D. Distinct MicroRNA Expression in Human Airway Cells of Asthmatic Donors Identifies a Novel Asthma-Associated Gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 47, 536–542 (2012), aislaron células epiteliales bronquiales de asmáticos y sanos, observando diferencias en la expresión del miR-203 que afecta al gen de la acuoporina 4 (AQP4). Por otra parte, se ha visto que el miR-21 y miR-126 presentan mayor expresión en pacientes asmáticos existiendo correlación entre los niveles de estos miARNs e IL-13 en cultivos de células epiteliales. Suojalehto, H. et al. Altered MicroRNA Expression of Nasal Mucosa in Long-Term Asthma and Allergic Rhinitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 163, 168–178 (2014), que utilizaron biopsias nasales, mostraron distintos perfiles de miARNs entre pacientes con asma (con y sin rinitis alérgica) y controles sanos con correlación positiva entre miR-155 y los valores del FE_{NO} (Fracción de Óxido Nítrico Exhalado), N_{NO} (Óxido Nítrico Nasal) e IL-13.

Por otro lado, un estudio en esputo mostró que miR-629-3p, miR-223-3p y miR-142-3p se encuentran incrementados en los asmáticos graves con asma neutrofílica y se correlacionan con los niveles elevados de neutrófilos.

En aliento exhalado condensado se estudió la expresión de miARNs entre asmáticos, pacientes de EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) y sanos, viendo diferencias y similitudes entre ambas patologías. De manera similar, otro grupo de investigadores utilizaron exosomas de aliento exhalado condensado identificando diferencias para 11 miARNs entre sanos y asmáticos.

Kho, A. T. et al. Circulating MicroRNAs: Association with Lung Function in Asthma. *PLoS One* 11, e0157998 (2016), estudiaron la expresión de miARNs en suero de pacientes

asmáticos leves y graves determinando que algunos miARNs muestran asociación con el valor de FEV1 (Fracción Espiratoria Volumétrica) / FVC (Capacidad vital forzada), FEV1% y con el FVC%, y actúan sobre genes de asma y FEV1. Panganiban, R. P. L. et al. Differential microRNA expression in asthma and the role of miR-1248 in regulation of IL-5. Am. J. Clin. Exp. Immunol. 1, 154–65 (2012), analizaron la expresión de miARNs en sueros de asmáticos y controles sanos, observando diferencias de expresión en miR-1248, miR-26a, Let7a y Let7d, así como una correlación negativa entre miR-26a y el valor de FEV1. Además, determinaron que IL-5 presenta regulación positiva por miR-1248.

Por otra parte, el miR-21 es un microARN que ha sido estudiado en diversas patologías como biomarcador, incluido en el asma. Los niveles de miR-21 sirven como biomarcador tanto para diferenciar asmáticos de sanos y el tratamiento con corticoides. Sawant, D. V et al. Serum MicroRNA-21 as a Biomarker for Allergic Inflammatory Disease in Children. MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates) 4, 36–40 (2015), también caracterizaron una mayor expresión de miR-21 en biopsias y suero de pacientes con asma y esofagitis eosinofílica. Panganiban, R. P. L. et al. Differential microRNA expression in asthma and the role of miR-1248 in regulation of IL-5. Am. J. Clin. Exp. Immunol. 1, 154–65 (2012), vieron diferencias de expresión en plasma de asmáticos, pacientes con rinitis alérgica y controles sanos.

En otros estudios se evaluó la funcionalidad de diversos miARNs *in vivo*. En modelos de ratón, se demostró que la inhibición de miR-126 inhibía el reclutamiento de eosinófilos, y que miR-19a actúa promoviendo la síntesis de citocinas Th2 en las vías aéreas mediante estudios de *knock out* y sobreexpresión del cluster miR-17~92.

Por otro lado, miR-3162-3p ha sido estudiado en relación a sus efectos sobre la supresión de β -catenina en asma en cultivos celulares de pulmón. En modelos de ratón, este miARN se ha detectado elevado en asma y la β -catenina disminuida, y un inhibidor del miARN disminuía la hiperreactividad aérea. Además, se conoce que el miR-221 disminuye la expresión de las kinasas p21^{kip1} y p21^{WAF1} incrementando la proliferación de células musculares lisas. En esta misma población celular se vio que miR-10a suprimía la vía de señalización mediante PI3K afectando a PIK3CA inhibiendo así la proliferación celular, detectándose a su vez que el miR-146a era capaz de reducir la expresión de COX-2 e IL-1 β y, a su vez, reducía también la de HuR (Proteína del antígeno R humano de unión a ARN).

Este último miARN también se conoce que inhibe la inflamación por IL-1 β en células epiteliales alveolares.

Según lo comentado anteriormente, se han observado diferencias de expresión de multitud de miARNs entre individuos sanos e individuos que padecen asma. Sin embargo, todavía existe la necesidad de proveer de herramientas clínicas con mayor sensibilidad, que sean capaces de apoyar el diagnóstico de asma de forma independiente a la presencia de inflamación exclusivamente Th2, a diferencia de como lo hacen otros marcadores (eosinófilos, óxido nítrico exhalado, periostina), ya que no todos los pacientes asmáticos (aproximadamente un 50%) presentan una sobreexpresión de esta vía causante de la inflamación, y que además permitan ayudar a clasificar la gravedad del asma entre asma intermitente o persistente leve y otras formas más graves de la enfermedad.

Breve descripción de la invención

La presente invención muestra que el miR-185-5p presenta niveles superiores de expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct \text{ miARN de interés (miR-185-5p)} - Ct \text{ miARN endógeno}$) en los pacientes asmáticos comparados con los individuos sanos (ver figura 4). Además, los niveles de expresión de miR-185-5p no solo son diferentes entre sanos y asmáticos, sino entre sanos y cada uno de los subgrupos de asmáticos (intermitentes, persistentes leves, persistentes moderados y persistentes graves). Los resultados muestran además que los últimos dos escalones de gravedad, los persistentes moderados y los persistentes graves, presentan un escalonamiento o aumento progresivo de la expresión del miR-185-5p en muestras de suero en comparación con pacientes asmáticos que presentan un cuadro patológico relacionado con asma intermitente o asma persistente leve (figura 5).

En base a los datos expuestos, entendemos que este biomarcador, el miR-185-5p en muestras obtenidas de forma no invasiva de sangre, suero o plasma, será de gran utilidad en el diagnóstico de los pacientes asmáticos independientemente de qué endotipo asmático presente. Además, tal y como se puede ver a lo largo de la presente invención, el biomarcador miR-185-5p es capaz de apoyar el diagnóstico de asma de forma independiente a la presencia de inflamación exclusivamente Th2.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Algoritmo diagnóstico del asma.

5 **Fig. 2.** Tratamientos actuales del asma y su estratificación para los distintos tratamientos según la guía española de manejo del asma (GEMA 4.0) en adultos.

Fig. 3. Posible algoritmo diagnóstico a utilizar con miR-185-5p para el diagnóstico clínico.

Fig. 4. Expresión relativa de miR-185-5p entre sanos y asmáticos

Fig. 5. Expresión relativa de miR-185-5p entre sanos y los distintos subgrupos de asmáticos.

10

Fig. 6. Área bajo la curva/Análisis de sensibilidad-especificidad Expresión relativa de miR-185-5p entre sanos y asma.

15

Fig. 7. Área bajo la curva/Análisis de sensibilidad-especificidad Expresión relativa de miR-185-5p entre sanos y los distintos subgrupos de asma según gravedad.

Fig. 8. Expresión relativa de miR 185-5p entre asmáticos de desarrollo juvenil y de desarrollo adulto. Los pacientes incluidos en el estudio que dio lugar a esta figura fueron preguntados por la edad de inicio del asma y se recogieron los años (Valor de 1 a 99 años) agrupándose en dos grupos según la edad de debut del asma: asma juvenil (De 1 a 17 años) y asma adulta (De 18 a 99 años).

20

Descripción detallada de la invención

25 Definiciones

Para los fines de la presente invención, a continuación, se incluyen las siguientes definiciones:

30 - en la presente invención, por “Asma” se entiende una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en cuya patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos y que cursa con hiper-respuesta bronquial (HRB) y una obstrucción variable del flujo aéreo,

total o parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente.

- el término "selección" se entiende como el examen o ensayo de un grupo de individuos que pertenecen a la población general, con riesgo de padecer asma, con el objetivo de distinguir los individuos sanos de los que padecen asma, más particularmente con el objetivo de distinguir la gravedad del asma entre aquellos individuos que padecen asma. Con objeto de ejemplarizar esta selección, la presente invención provee de un algoritmo diagnóstico útil para realizar los criterios de selección de acuerdo con la presente definición, ver figura 3.

- En la presente invención, el término "miR-185-5p" se refiere al miARN con la siguiente secuencia madura: 5'-UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA-3'. Tal y como se muestra en las figuras de la presente invención, la expresión relativa del miR-185-5p (comparada con un miARN endógeno de expresión similar en sanos y asmáticos) es superior en pacientes asmáticos, cuando es comparada con la expresión en individuos sanos. Esta expresión superior en pacientes permite, además, la diferenciación entre sanos y asmáticos debido a que el análisis del área bajo la curva ROC es de 0.78 con IC (95%) de 0.67-0.89, ver figura 6.

- La expresión "regulado positivamente" o "sobre-expresado" referida a cualquiera de los microARN o combinaciones de los mismos descritas en la presente invención, se refiere a un aumento en su nivel de la expresión con respecto a un "valor umbral" o "valor límite" dado de al menos un 5 %, de al menos un 10 %, de al menos un 15 %, de al menos un 20 %, de al menos un 25 %, de al menos un 30 %, de al menos un 35 %, de al menos un 40 %, de al menos un 45 %, de al menos un 50 %, de al menos un 55 %, de al menos más de un 60 %, de al menos más de un 65 %, de al menos un 70 %, de al menos un 75 %, de al menos un 80 %, de al menos un 85 %, de al menos un 90 %, de al menos un 95 %, de al menos un 100 %, de al menos un 110 %, de al menos un 120 %, de al menos un 130 %, de al menos un 140 %, de al menos un 150 %, o más.

- En la presente memoria con objeto de separar el número entero de los decimales se utiliza el modo anglosajón utilizando por tanto un punto en vez de una coma.

- La expresión "valor umbral" o "valor límite", cuando hace referencia a los niveles de expresión de los miARN descritos en la presente invención, se refiere a un nivel de la expresión de referencia indicativo de que es probable que un sujeto padezca asma o un tipo de asma determinado como asma intermitente o asma persistente leve,

moderado o grave con una sensibilidad y especificidad dadas si los niveles de expresión del paciente están por encima de dichos niveles umbral, límite o de referencia.

- La expresión "que comprende" pretende incluir, pero sin limitación, lo que sigue a la expresión "que comprende". Por lo tanto, el uso de la expresión "que comprende" indica que los elementos citados son necesarios u obligatorios, pero que son opcionales otros elementos y existe la posibilidad de que estén presentes o no.
- Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a lo que sigue a la expresión "que consiste en". Por lo tanto, la expresión "que consiste en" indica que los elementos citados son necesarios u obligatorios y que no puede estar presente ningún otro elemento.
- También debe tenerse en cuenta que el término "kit", como se usa en el presente documento, no está limitado a ningún dispositivo específico e incluye cualquier dispositivo adecuado para poner en práctica la invención tal como, pero sin limitación, micromatrices, biomatrices, biochips o matrices de biochips.

En la técnica anterior se conoce una diversidad de métodos estadísticos y matemáticos para establecer el nivel umbral o límite de expresión. Un nivel de expresión umbral o límite para un biomarcador particular puede seleccionarse, por ejemplo, basándose en datos de los gráficos de características operativas del receptor (ROC), como se describe en los Ejemplos y Figuras de la presente invención. Un experto en la materia apreciará que estos niveles de expresión umbral o límite pueden variarse, por ejemplo, moviéndose a lo largo del gráfico ROC para el biomarcador particular de la presente invención, para obtener diferentes valores de sensibilidad o especificidad, afectando de esta manera al rendimiento global del ensayo. Por ejemplo, si el objetivo es tener un método de diagnóstico sólido desde el punto de vista clínico, se debería intentar tener una alta sensibilidad. Sin embargo, si el objetivo es tener un método económico, se debería intentar conseguir una alta especificidad. El mejor límite se refiere al valor obtenido a partir del gráfico ROC para el biomarcador particular de la presente invención que produce la mejor sensibilidad y especificidad. Los valores de sensibilidad y especificidad se calculan sobre el intervalo de umbrales (límites). De esta manera, los valores umbral o límite pueden seleccionarse de tal forma que la sensibilidad y/o especificidad sean al menos de aproximadamente un 70%, y pueden ser, por ejemplo, de al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al menos

un 100% en al menos el 60% de la población de pacientes ensayada, o en al menos el 65 %, 70 %, 75 % u 80 % de la población de pacientes ensayada.

5 Por consiguiente, cada una de las realizaciones citadas a lo largo de la presente invención preferentemente se realiza determinando los niveles de expresión de al menos miR-185-5p en una muestra aislada a partir de un sujeto a diagnosticar o explorar, y comparando los niveles de expresión de dicho microARN con valores umbral o límite predeterminados.

DESCRIPCIÓN

10

Tal y como ya se ha expresado, en la presente invención, por asma se entiende una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en cuya patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos y que cursa con HRB y una obstrucción variable del flujo aéreo, total o
15 parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente. El asma es un síndrome heterogéneo que resulta de interacciones complejas entre factores ambientales y genéticos. Las clasificaciones más comúnmente empleadas son en base a su gravedad y al grado de control alcanzado con el tratamiento.

20

En la tabla 1 se describe su clasificación en base a su gravedad según la guía española de manejo del asma (GEMA 4.0) en adultos:

Tabla 1. Clasificación del asma por su gravedad (antes del tratamiento).

	Intermitente	Persistente leve	Persistente moderada	Persistente grave
Síntomas diurnos	No (2 veces o menos a la semana)	Más de 2 veces a la semana	Síntomas a diario	Síntomas continuos (varias veces al día)
Medicación de alivio (agonista β_2 -adrenérgico de acción corta)	No (2 veces o menos /semana)	Más de 2 veces a la semana pero no a diario	Todos los días	Varias veces al día
Síntomas nocturnos	No más de 2 veces al mes	Más de 2 veces al mes	Más de una vez a la semana	Frecuentes
Limitación de la actividad	Ninguna	Algo	Bastante	Mucha
Función pulmonar (FEV ₁ o PEF) % teórico	> 80 %	> 80 %	> 60 % - < 80 %	≤ 60 %
Exacerbaciones	Ninguna	Una o ninguna al año	Dos o más al año	Dos o más al año

FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; PEF: flujo espiratorio máximo.

- 5 En la tabla 2 se resume la clasificación en base al control del asma según la guía española de manejo del asma (GEMA 4.0) en adultos.

Tabla 2. Clasificación del asma en adultos en base a su control

	BIEN controlada (Todos los siguientes)	PARCIALMENTE controlada (Cualquier medida en cualquier semana)	MAL controlada
Síntomas diurnos	Ninguno o ≤ 2 veces a la semana	> 2 veces a la semana	Si ≥ 3 características de asma parcialmente controlada
Limitación de actividades	Ninguna	Cualquiera	
Síntomas nocturnos/ despertares	Ninguno	Cualquiera	
Necesidad medicación de alivio (rescate) (SABA)	Ninguna o ≤ 2 veces a la semana	> 2 veces a la semana	
Función pulmonar - FEV ₁ - PEF	> 80 % del valor teórico > 80 % del mejor valor personal	< 80 % del valor teórico < 80 % del mejor valor personal	
Exacerbaciones	Ninguna	≥ 1 /año	≥ 1 en cualquier semana

FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; PEF: flujo espiratorio máximo; ACT: test de control del asma; ACQ: cuestionario de control del asma. SABA: agonista β_2 -adrenérgico de acción corta

- 5 Los tratamientos actuales del asma y su estratificación para los distintos tratamientos según la guía española de manejo del asma (GEMA 4.0) en adultos se muestran en la figura 2, donde se puede comprobar que dichos tratamientos se seleccionan de la lista que comprende los siguientes (se hace notar que esta lista no tiene carácter exhaustivo): antagonistas de los receptores de los leucotrienos, glucocorticoides inhalados, agonistas beta2 adrenérgicos de acción larga y agonistas beta 2 adrenérgicos de acción corta, así como tratamientos con anti-IL 5 o anti-IL4/IL-13.

15 Actualmente, el diagnóstico del asma se basa en manifestaciones clínicas y en demostrar la obstrucción reversible de las vías respiratorias siguiendo un algoritmo similar al propuesto en la figura 1.

Con respecto a los biomarcadores de asma conocidos hasta la fecha atendemos a la siguiente clasificación:

1. Dentro de los biomarcadores no agresivos o no invasivos disponemos de pocas herramientas. La determinación de **eosinófilos** en sangre es una de ellas. En este sentido, los eosinófilos en sangre ($>$ de 300 eosinófilos/ μ L) es un hallazgo que apoya, junto con los síntomas y la variabilidad de la obstrucción bronquial, el diagnóstico de asma. Sin embargo, no toda asma se acompaña de eosinofilia. La ausencia de eosinofilia es también un marcador de buena respuesta al tratamiento con esteroides, tanto inhalados como sistémicos, y con terapias biológicas como el tratamiento con anti-IL 5 o anti-IL4/IL-13. Se considera como un marcador también de activación inmunológica de tipo Th2.
2. La determinación del componente inflamatorio mediante el estudio de la celularidad por citometría de flujo en el esputo inducido de los pacientes también se usa como método que contribuye al diagnóstico y seguimiento del paciente asmático.
3. La determinación de **FeNO** se usa como apoyo en el diagnóstico de asma, así como de buena respuesta a los mismos fármacos que determina la eosinofilia. Es un marcador de activación de la vía inmunitaria Th2. Su especificidad aumenta al poner el punto de corte en más de 50 ppb, pero por el contrario su sensibilidad en este punto de corte es más baja.
4. La **periostina** en sangre se está investigando como biomarcador de asma. Depende de la activación inmunológica Th2 y de otros mecanismos. Su sensibilidad global es relativamente baja, pues como ocurre con los anteriores marcadores, solo detectan activación de la vía inmunológica Th2 y hay muchos pacientes asmáticos cuya inflamación bronquial depende de otras vías.
5. Otros biomarcadores que actualmente se encuentran en desarrollo son la determinación en sangre de dipeptidil peptidasa-4, la determinación de la temperatura del aire exhalado o la determinación del pH en el condensado del aire exhalado, así como la determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOC) en aire exhalado, y que podrían ser también de utilidad en el diagnóstico del asma.
6. Con respecto a los marcadores de la gravedad en el asma, el más utilizado es la determinación de eosinófilos en sangre o en el esputo. Algunas pruebas de función pulmonar, como la propia espirometría o la determinación del volumen residual, pueden ayudar a determinar la gravedad del asma. Las nuevas técnicas de imagen pulmonar se están investigando para intentar fenotipar el asma por su potencial gravedad.

A nivel clínico y en relación con la dificultad diagnóstica, la presencia diferencial de ciertos miARNs tendría la ventaja de ser un marcador con mayor sensibilidad, apoyando el diagnóstico de asma de forma independiente a la presencia de inflamación exclusivamente Th2, a diferencia de como lo hacen otros marcadores (eosinófilos, óxido nítrico exhalado, periostina), ya que no todos los pacientes asmáticos (aproximadamente un 50%) presentan una sobreexpresión de esta vía causante de la inflamación.

El presente estudio muestra que miR-185-5p presenta niveles superiores de expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct \text{ miARN de interés (miR-185-5p)} - Ct \text{ miARN endógeno}$) en los pacientes asmáticos comparados con los individuos sanos (figura 4).

Además, los niveles de expresión de miR-185-5p no sólo son diferentes entre sanos y asmáticos, sino entre sanos y cada uno de los subgrupos de asmáticos (intermitentes, persistentes leves, persistentes moderados y persistentes graves). Los resultados muestran además que los últimos dos escalones de gravedad, los persistentes moderados y persistentes graves presentan un escalonamiento o aumento progresivo de su expresión en comparación con intermitentes y persistentes leves (figura 5).

Para caracterizar la posibilidad de utilizar la expresión de miR-185-5p en muestras biológicas de sangre, suero o plasma como biomarcador de asma, se realizaron curvas ROC que compararan los niveles de expresión de miR-185-5p entre sanos y asmáticos. Tal y como se puede comprobar en los resultados aportados en la presente memoria, el miR-185-5p fue capaz de discriminar individuos sanos de pacientes asmáticos (figura 6), y entre individuos sanos y cada uno de los subgrupos de asmáticos (figura 7). Los resultados de los niveles de expresión relativa de cada miARN fueron analizados mediante curva ROC para determinar si esta diferencia de expresión entre sanos y asmáticos presentaba un punto de corte que fuera capaz de diferenciar entre ambos y clasificar los ARNs. El punto de corte definido es en el que el índice de Youden fue más elevado (definido como sensibilidad más especificidad menos 1), por lo que se podrían definir otros puntos de corte de acuerdo a las necesidades de sensibilidad o especificidad en el requeridas de acuerdo a la aplicación.

Por lo tanto, los niveles de expresión del miR-185-5p en muestras biológicas no invasivas de sangre, suero o plasma, podrían proporcionar un biomarcador útil para diagnosticar o seleccionar entre pacientes asmáticos y no asmáticos, apoyando el diagnóstico de asma de

forma independiente a la presencia de inflamación exclusivamente Th2, y determinar la potencial gravedad del asma en aquellos pacientes asmáticos.

En base a los datos expuestos, entendemos que este biomarcador será de gran utilidad en el diagnóstico de los pacientes asmáticos independientemente de qué endotipo asmático presente. miR-185-5p además es un posible regulador de genes implicados en la respuesta alérgica como la periostina, ya que el gen *POSTN* es un gen diana teórico (no confirmado mediante procedimientos experimentales) según herramientas bioinformáticas de predicción de targets de ARN miARNs según su secuencia (miRSystem).

En resumen, la presente memoria identifica por primera vez al miR-185-5p, comúnmente desregulado en muestras biológicas mínimamente invasivas, tal como una muestra de plasma, muestra de sangre, muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) o una muestra de suero, como un biomarcador útil en el diagnóstico/pronóstico/selección de pacientes que padecen asma.

De esta manera, un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderado o grave, que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde la sobreexpresión de al menos miR-185-5p es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma, en particular distinguiendo entre el riesgo de padecer asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderado o grave.

Otra realización preferida de la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma intermitente o persistente leve que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde la diferencia de expresión de al menos miR-185-5p con

dicho patrón o nivel de expresión ya establecido es indicativa de riesgo de que el individuo padezca de asma intermitente o persistente leve.

Otra realización preferida de la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma persistente moderado o grave que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde la diferencia de expresión de al menos miR-185-5p con dicho patrón o nivel de expresión ya establecido es indicativa de riesgo de que el individuo padezca de asma persistente moderado o grave.

Aun, otra realización preferida de la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma con anterioridad a los 18 años, es decir asma juvenil, y aquellos con riesgo de padecer asma durante la etapa adulta que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde la diferencia de expresión de al menos miR-185-5p con dicho patrón o nivel de expresión ya establecido es indicativa de riesgo de que el individuo padezca de asma durante la etapa adulta o durante la etapa juvenil.

Aun, otra realización preferida de la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar sujetos con asma de mayor gravedad de aquellos con asma de menor gravedad, donde por asma de “mayor gravedad” se entiende aquellos individuos que desarrollarán asma durante su edad adulta y/o que padecen de asma persistente moderada o grave, y donde por asma de “menor gravedad” se entiende aquellos individuos que desarrollarán asma durante su edad juvenil y/o que padecen de asma intermitente o persistente leve, que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde la diferencia de expresión de al menos miR-185-5p con dicho patrón o nivel de expresión ya establecido es

indicativa de la gravedad del asma diferenciando entre sujetos con asma de menor gravedad de aquellos con asma de mayor gravedad.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de asma y/o la gravedad de la enfermedad y/o seleccionar entre individuos que desarrollen asma durante la etapa adulta o durante la etapa juvenil por medio de un examen clínico. En particular, utilizando cualquiera de los biomarcadores adicionales al miR mencionados anteriormente.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para obtener datos útiles para el diagnóstico/pronóstico *in vitro* de asma, diferenciando entre sujetos con asma de menor gravedad de aquellos con asma de mayor gravedad, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para clasificar sujetos como sujetos sanos o como sujetos que padecen asma, diferenciando entre sujetos con asma de menor gravedad de aquellos con asma de mayor gravedad, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma, diferenciando entre sujetos con asma de menor gravedad de aquellos con asma de mayor gravedad, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos que padecen asma, diferenciando entre sujetos con asma de menor gravedad de aquellos con asma de mayor gravedad, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave. Preferentemente, el paciente se trata con antagonistas de los receptores de los leucotrienos, glucocorticoides inhalados, agonistas beta2 adrenérgicos de acción larga o agonistas beta 2 adrenérgicos de acción corta, dependiendo del resultado del diagnóstico. Ni que decir tiene que este tratamiento se determinará de acuerdo con la gravedad del asma y de acuerdo con las pautas normalmente establecidas para dicho escalón de gravedad, en particular, las pautas de tratamiento incluyendo las dosis y el número y forma de administración, así como los tipos de tratamientos se establece de acuerdo a lo descrito en la figura 2.

En otra realización preferida del método de acuerdo con cualquiera de los métodos del primer al quinto aspectos de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra biológica mínimamente invasiva de los sujetos a seleccionar, tal como una muestra de plasma, una muestra de sangre, una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) o una muestra de suero.

En otra realización preferida adicional del método de acuerdo con cualquiera de los métodos del primer al sexto aspectos de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, el sujeto es un sujeto humano.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de cualquiera de los biomarcadores o cualquiera de las combinaciones de biomarcadores mencionadas en los métodos del primer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas, donde la sobreexpresión o diferencias de expresión de cualquiera de estos biomarcadores es indicativa de riesgo de desarrollar asma, diferenciando entre sujetos con asma de menor gravedad de aquellos con asma de mayor gravedad, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de desarrollar asma, diferenciando entre

sujetos con asma de menor gravedad de aquellos con asma de mayor gravedad, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave.

- 5 Una realización preferida del séptimo aspecto de la invención se refiere al uso del kit, donde dicho kit comprende reactivos para determinar un nivel de la expresión diferencial de al menos miR-185-5p, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de tener asma, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave.

10

En una realización preferida del uso del kit de acuerdo con el séptimo aspecto la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, dichos reactivos se seleccionan del grupo que consiste en todos o en al menos uno de los siguientes: i) cebadores específicos para el miARN o combinaciones de miARN como se definen en cualquiera de dichos aspectos o
15 realizaciones preferidas capaces de producir secuencias de miARN ligadas al cebador; ii) medios de transcripción inversa para producir ADN complementario (ADNc) a partir de las secuencias de miARN ligadas al cebador de i); iii) medios tales como cebadores capaces de amplificar los ADNc derivados de las secuencias de miARN ligadas al cebador como se define en i); iv) medios para transcribir los ADNc amplificados para producir ARN diana con
20 sentido; y v) una población de sondas antisentido de miARN capaces de detectar los ARN diana con sentido de iv).

Por otra parte, debe mencionarse que la presente invención preferentemente se realiza en muestras de plasma o suero obtenidas a partir de los pacientes. Por otra parte, es
25 importante subrayar que la obtención de preparaciones de suero o plasma a partir de sangre comprende varias etapas realizadas por los técnicos: en el caso del suero, se deja coagular la sangre dejándola en reposo a temperatura ambiente, se retira el coágulo por centrifugación y se aísla el sobrenadante que se denomina suero. En el caso del plasma, también se necesita centrifugación. Además, después del proceso de centrifugación, es
30 importante transferir inmediatamente el componente líquido (suero o plasma) a un tubo limpio. Las muestras se mantienen a 2-8 °C mientras se manipulan. Si el suero o plasma no se analiza inmediatamente, debe dividirse en alícuotas, almacenarse, y transportarse a -80 °C o a una temperatura inferior. Es importante evitar los ciclos de congelación-

descongelación porque esto es perjudicial para muchos componentes del suero. Las muestras hemolizadas, ictéricas o lipémicas pueden invalidar ciertos ensayos.

Las invenciones descritas de forma ilustrativa en el presente documento pueden ponerse en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no desveladas específicamente en el presente documento. De esta manera, por ejemplo, las expresiones "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. deben considerarse en sentido amplio y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados en el presente documento se han usado con fines descriptivos y no limitantes, y no hay ninguna intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, sino que se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. De esta manera, debe entenderse que, aunque la presente invención se ha desvelado de forma específica por realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a modificaciones y variaciones de la invención incorporada y desvelada en el presente documento, y que dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta invención.

La invención se ha descrito en el presente documento en sentido amplio y genérico. También forman parte de la invención cada uno de los agrupamientos de especies y subgenéricos más restringidos que están incluidos en la descripción genérica. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimina cualquier materia objeto del género, independientemente de si el material eliminado se ha mencionado específicamente en el presente documento.

Dentro de las siguientes reivindicaciones y ejemplos no limitantes se incluyen otras realizaciones. Además, cuando se describen características o aspectos de la invención refiriéndose a grupos, los expertos en la materia reconocerán que la invención también se describe refiriéndose a cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

- Pacientes y recogida de muestras

Las muestras que se utilizaron en el presente estudio pertenecen a una colección de muestras de biobanco de individuos asmáticos que se creó en el año 2006 en el entorno de la RED RESPIRA, financiada por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Los individuos asmáticos fueron seleccionados entre los pacientes que acudían al servicio de Alergología y Neumología de los hospitales integrantes de la RED (Madrid, Canarias y Barcelona). Los individuos sanos que participaron en el estudio, pertenecían al personal del servicio de Alergia e Inmunología del área de investigación del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD).

La obtención de muestras biológicas, de sangre periférica por venipuntura, se llevó a cabo siempre tras la confirmación de participación en el estudio y la firma del consentimiento informado por parte de todos los individuos. En dicho consentimiento se explica al paciente el proyecto que se intenta acometer y se indica su aprobación previa por parte del Comité Ético del IIS-FJD, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Así mismo los pacientes incluidos en dicho estudio fueron preguntados por la edad de inicio del asma y se recogieron los años (Valor de 1 a 99 años) agrupándose en dos grupos según la edad de debut del asma: asma juvenil (De 1 a 17 años) y asma adulta (De 18 a 99 años).

La selección de los sujetos de estudio estuvo restringida a una serie de criterios de inclusión que se detallan a continuación para cada grupo de individuos.

- Individuos sanos. Son individuos no fumadores, sin historial de asma ni enfermedades alérgicas y/o BENA.
- Individuos con asma. Todos los pacientes de este grupo fueron diagnosticados como asmáticos siguiendo los criterios establecidos según la *American Thoracic Society*. Estos individuos mostraron una mejoría superior al 12% en el volumen espiratorio forzado durante los primeros 10 minutos tras la administración de terbutalina inhalada, teniendo una prueba de metacolina positiva (PC20 inferior a 16 mg/ml (en particular inferior a < 8 mg/ml), lo que implica hiper-reactividad de las vías aéreas. Los pacientes asmáticos se clasificaron en función de la gravedad de su fenotipo asmático en 4 subgrupos: asmáticos intermitentes, asmáticos persistentes leves, asmáticos persistentes moderados y asmáticos persistentes graves, siguiendo las directrices creadas por la GUÍA GEMA, una guía elaborada a nivel estatal para el

manejo del asma (GEMA4.0. Guía española para el manejo del asma). Se incluyeron tanto pacientes atópicos como no atópicos.

Extracción de miARNs

5

Para la extracción de miARNs de muestras de fluidos biológicos se utilizó el kit miRCURY ARN Isolation Kit-Biofluids (Bionova, Exiqon, Copenhagen, Dinamarca), y se realizó la extracción siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera resumida, las muestras de suero se descongelan y centrifugan a 3000g durante 5 minutos. A continuación, se toman 10 200 µL de sobrenadante, y se pasan a un tubo nuevo, que será el volumen inicial de muestra con el que se trabajará. A continuación, se añaden 60 µL de Lysis solution BF al que previamente se le ha añadido 1 µL del Spike In mix (miRCURY LNA™ Universal RT microARN PCR, ARN Spike-in kit), en el que se encuentran tres miARNs sintéticos (UniSp2, UniSp4, UniSp5), que están a distintas concentraciones y que sirven como control de que la 15 extracción se ha realizado correctamente. Se deja incubar 1-3 minutos a temperatura ambiente (RT). Se añaden 20 µL de Protein Precipitation Solution BF. Se agita con vórtex e incuba 1 minuto a RT. Se centrifuga 3 minutos a 11000g y se toma el sobrenadante, al que se le añaden 270 µL de isopropanol, para la separación de ácidos nucleicos. El volumen de muestra e isopropanol se pasa por una columna del kit mediante centrifugación durante 30 20 segundos a 11000g, previa incubación de la muestra en la columna durante 2 minutos. Los ácidos nucleicos quedan atrapados en la columna, por lo que a continuación han de ser lavados mediante la utilización de distintos volúmenes de Wash Solution BF I y II. Tras los lavados se trata la membrana de la columna a la que están unidos los ácidos nucleicos con ADNsa durante 15 minutos y se repiten los lavados anteriores. Finalmente se toma la 25 columna y se coloca en un eppendorf de 1.5 ml. Se incuba la membrana con 50 µL de H₂O ARNlibre de ARNsas durante 1 minuto, y se centrifuga a 11000g durante 1 minuto. El volumen de elución de ARN (enriquecido en miARNs) son 50 µLARNARN, que se almacenarán a -80°C hasta su utilización.

30 - **Análisis de la expresión de miARN por qRT-PCR en tiempo real**

La retrotranscripción a cADN se realiza mediante el sistema Universal cADN Synthesis kit II (Bionova, Exiqon, Copenhagen, Dinamarca) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente se prepara una mezcla de las enzimas y sondas, que luego se añade a cada

tubo de PCR. Esta mezcla consta de 2 μ L de Reaction buffer, 4.5 μ L de H₂O libre de ARNsas y 1 μ L de enzima retrotranscriptasa inversa para cada muestra. Finalmente se añadirán 2 μ L de muestra (ARN). Hay que añadir además un control de la correcta realización de la retrotranscripción, que va a ser el synthetic ARN spike in (Sp6), del cual se añaden 0.5 μ L por tubo de muestra.

Finalmente se realiza la qRT-PCR en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem, Warrington, Reino Unido). El programa de temperaturas y tiempos a aplicar es el siguiente:

- 60 minutos a 42°C
- 5 minutos mantenido a 95°C
- Guardar a 4°C o congelar a -20 °C

Para realizar la qPCR o PCR en Tiempo Real se utiliza el cADN obtenido al retrotranscribir los miARNs extraídos de muestras de suero. El cADN se ha de encontrar diluido 40 veces (dilución 1:40) para su utilización en la qPCR. Se elabora una mezcla que ha de estar compuesta por las enzimas, los nucleótidos fluorescentes y el cADN molde. Para ello se utiliza el kit ExiLENT SYBR® Green master mix (Bionova) y determinadas sondas específicas para cada miARN que queramos estudiar, las cuales serán las sondas microARN LNA™ PCR primer sets (Bionova).

Cada una de estas mezclas se prepara en un pocillo de una placa de 96 pocillos microplate PCR 96 for LC480 (Roche, Basilea, Suiza), y consta de 5 μ L de PCR Master mix, 1 μ L del primer o cebador específico del miARN y 4 μ L del cADN diluido 1:40. La PCR se lleva a cabo en un termociclador Light Cycler 96 (Roche). El protocolo a aplicar es el siguiente:

- Pre-incubación 10 minutos a 95°C
- Amplificación en 2 pasos, primero a 95°C durante 10 segundos y luego a 60°C 1 minuto, realizando un total de 45 ciclos
- Fusión en tres pasos, primero a 95°C durante 5 segundos, 65°C 1 minuto y 97°C durante 1 segundo
- Enfriamiento a 40°C durante 10 segundos.
- Guardar a -20°C hasta su utilización.

Los resultados se analizan utilizando el software informático LightCycler® 96 SW 1.1 (Roche). Como controles endógenos o housekeeping miARNs, se utilizan los miARNs recomendados por el fabricante: hsa-miR-103a-3p y hsa-miR-191-5p. La expresión génica de cada miARN se analiza para cada muestra usando el valor de Ct (*Cycle Threshold*) obtenido de la qPCR. Los resultados de expresión de los controles endógenos obtenidos mediante qPCR se muestran en umbral de ciclos (Ct), que se requieren para llegar a una determinada fluorescencia, dada por la cantidad de cADN en ese ciclo. De esta forma, al amplificar la qPCR de manera exponencial el cADN, a mayor concentración inicial de cADN, que es sintetizado a partir de un determinado miARN, menor el ciclo en alcanzar el umbral de fluorescencia. La expresión génica relativa se calcula de la siguiente manera: $2^{-\Delta Ct}$; donde $\Delta Ct = Ct \text{ miARN de interés (miR-185-5p)} - Ct \text{ miARN endógeno}$.

Análisis de los datos

Se llevan a cabo comparaciones entre grupos de pacientes mediante el test paramétrico T de Student cuando los pacientes presenten valores que cumplan distribución normal o Gaussiana, mientras que se realiza el test de Mann-Whitney, para muestras que no superen el test de normalidad (muestras no paramétricas). Se realiza el test de ANOVA con un test estadístico posterior de Bonferroni para comparaciones entre más de dos grupos, si cumplen con distribución normal, o bien test no paramétricos para muestras que no presenten una distribución normal. Para muestras no paramétricas se realiza el test de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. Se determinan valores como estadísticamente significativos a partir de un p valor menor de 0.05 ($p < 0.05$). Los resultados de las comparaciones de expresión entre miARNs se muestran con valor de la media más menos ($\pm$) el error estándar de la media (SEM) y datos de la clínica con la media y la desviación estándar (SD). Los cálculos estadísticos y la elaboración de las gráficas se llevan a cabo utilizando el programa GraphPad InStat 3 y GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, Estados Unidos). Se realizan curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para la definición de biomarcadores, tomando como valores positivos aquellos cuya área bajo la curva (AUC) sea mayor de 0.7. Estas curvas se utilizan en salud para definir marcadores de enfermedad, tomando las curvas cuya área bajo la curva fuera > 0.7 , que tengan valores de sensibilidad y especificidad elevados. Las curvas ROC muestran en el eje Y valores de sensibilidad del 0 al 1, siendo el valor de 1 el de mayor sensibilidad, y en el eje X valores de 1-especificidad, por lo que a mayor sea la especificidad, menor será el valor de X. Una curva

perfecta estaría definida por valores de 1 de sensibilidad y especificidad (estando por lo tanto los valores en el eje X cuanto más cercanos al 0 mejor). A partir de la curva se va a definir un punto de corte que es el que presentará las mejores características de sensibilidad y especificidad requeridas para su utilización como biomarcador. Este punto de corte es el valor de la curva que sea más cercano a la esquina superior izquierda de la gráfica, es decir el punto que representa mayor área bajo la curva.

Ejemplo 1. El perfil de expresión del miARN analizado distingue entre sujetos sanos e individuos que padecen asma.

El presente estudio muestra que miR-185-5p presenta niveles superiores de expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$; donde $\Delta Ct = Ct \text{ miARN de interés (miR-185-5p)} - Ct \text{ miARN endógeno}$) en los pacientes asmáticos comparados con los individuos sanos (Figura 4). Además, los niveles de expresión de miR-185-5p no sólo son diferentes entre sanos y asmáticos, sino entre sanos y cada uno de los subgrupos de asmáticos (intermitentes, persistentes leves, moderados y graves). Los resultados muestran además que los últimos dos escalones de gravedad, los persistentes moderados y graves presentan un escalonamiento o aumento progresivo de su expresión en comparación con intermitentes y persistentes leves (Figura 5).

Para caracterizar la posibilidad de utilizar la expresión de miR-185-5p en suero como biomarcador de asma se realizaron curvas ROC que compararan los niveles de expresión de miR-185-5p entre sanos y asmáticos. El miR-185-5p fue capaz de discriminar a individuos sanos de pacientes asmáticos (figura 6), y entre los individuos sanos y cada uno de los subgrupos de asmáticos (figura 7). Los resultados de las curvas ROC muestran que los niveles de expresión de miR-185-5p no solo son superiores en asmáticos respecto a sanos, sino que a partir de un determinado punto de corte definido por un nivel de expresión génica pueden discriminar entre sano y asmático. El punto de corte definido es en el que el índice de Youden es más elevado (definido como sensibilidad más especificidad menos 1), por lo que se podrían definir otros puntos de corte con facilidad.

Otro resultado a tener en cuenta es la mayor expresión de este miARN en pacientes que desarrollaron asma en edad adulta (>18 años), comparado con los que presentaron asma de desarrollo juvenil. El asma de desarrollo adulto suele ser más grave que el de desarrollo

juvenil, que con el tiempo puede remitir o incluso desaparecer, mientras que el asma de desarrollo adulto permanece (figura 8). Este resultado proporciona una correlación entre los niveles de expresión de este miARN y el asma de mayor gravedad.

5 En cualquier caso, una de las principales características de este biomarcador es la capacidad de diferenciar a individuos sanos de pacientes asmáticos según sus niveles de expresión relativa a partir de un nivel umbral, bajo una determinada sensibilidad y especificidad. A diferencia del resto de biomarcadores asociados al asma como la eosinofilia, niveles de periostina, etc., que solamente diferencian a individuos sanos de
10 asmáticos cuando estos presentan asma asociada a Th2, el biomarcador miR-185-5p se expresa en asmáticos independientemente de que su asma sea o no asociada a Th2. Es por eso que miR-185-5p resulta en un excelente biomarcador asociado a asma que no depende de que el paciente asmático presente inflamación de tipo Th2 para su detección, sino que es un marcador con mayor vinculación al asma.

15

Además, debido a que su expresión aumenta según la gravedad del paciente, es muy posible que este biomarcador se encuentre asociado a la inflamación asmática y que, por lo tanto, puede ser un marcador importante a la hora de determinar la gravedad del asma del paciente y sirva de herramienta diagnóstica para determinar cuándo un individuo
20 desarrollará un proceso asmático, diferenciando si dicho desarrollo se producirá a lo largo de la edad adulta o con anterioridad.

Por lo tanto, podría ser un marcador para determinar la potencial gravedad del asma, también de forma independiente a la vía Th2.

25

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde la sobreexpresión de al menos miR-185-5p es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma de forma independiente a la presencia de inflamación exclusivamente Th2.
2. Método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma intermitente o persistente leve que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde la diferencia de expresión de al menos miR-185-5p con dicho patrón o nivel de expresión ya establecido es indicativa de riesgo de que el individuo padezca de asma intermitente o persistente leve.
3. Método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma persistente moderada o grave que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde la diferencia de expresión de al menos miR-185-5p con dicho patrón o nivel de expresión ya establecido es indicativa de riesgo de que el individuo padezca de asma persistente moderada o grave.
4. Método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma persistente moderado o grave o asma intermitente o persistente leve que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, de los sujetos a seleccionar con un

patrón o nivel de expresión ya establecido, donde la diferencia de expresión de al menos miR-185-5p con dicho patrón o nivel de expresión ya establecido determinará el riesgo de que el individuo padezca de asma persistente moderada o grave o que el individuo desarrolle asma intermitente o persistente leve.

5

5. Método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma con anterioridad a los 18 años, durante la etapa juvenil, y aquellos con riesgo de padecer asma durante la etapa adulta (> 18 años) que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos miR-185-5p, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde la diferencia de expresión de al menos miR-185-5p con dicho patrón o nivel de expresión ya establecido es indicativa de riesgo de que el individuo desarrolle asma durante la etapa adulta o durante la etapa juvenil.

15

6. Método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 5, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de asma y/o la gravedad de la enfermedad por medio de un examen clínico.

20

7. Método para obtener datos útiles para el diagnóstico/pronóstico *in vitro* de asma, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 5.

25

8. Método *in vitro* para clasificar sujetos como sujetos sanos o como sujetos que padecen asma, en particular distinguiendo la gravedad del asma, más particularmente distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 5.

30

9. Método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma, en particular distinguiendo la gravedad del asma, más particularmente distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma

persistente moderada o grave, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 5.

- 5 10. Método para tratar sujetos que padecen asma, en particular distinguiendo la gravedad del asma, más particularmente distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 5, y (c) tratar al
10 paciente al que se le ha diagnosticado asma, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave.
11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra biológica mínimamente invasiva de los sujetos a seleccionar, tal como una muestra de plasma,
15 una muestra de sangre, una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) o una muestra de suero.
12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sujeto es un sujeto humano.
20
13. Uso de un kit que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos miR-185-5p, donde la sobreexpresión o diferencias de expresión de miR-185-5p es indicativa de riesgo de tener asma, en particular distinguiendo la gravedad del asma, más particularmente distinguiendo
25 entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de tener asma, en particular distinguiendo entre asma intermitente o persistente leve y asma persistente moderada o grave.
14. El uso del kit de acuerdo con la reivindicación anterior, donde dichos reactivos se
30 seleccionan del grupo que consiste en todos o en al menos uno de los siguientes: i) cebadores específicos para el miARN o combinaciones de miARN como se definen en cualquiera de dichos aspectos o realizaciones preferidas capaces de producir secuencias de miARN ligadas al cebador; ii) medios de transcripción inversa para producir ADNc a partir de las secuencias de miARN ligadas al cebador de i); iii)

medios tales como cebadores capaces de amplificar los ADNc derivados de las secuencias de miARN ligadas al cebador como se define en i); iv) medios para transcribir los ADNc amplificados para producir ARN diana con sentido; y v) una población de sondas anti-sentido de miARN capaces de detectar los ARN diana con sentido de iv).

5

Fig. 1

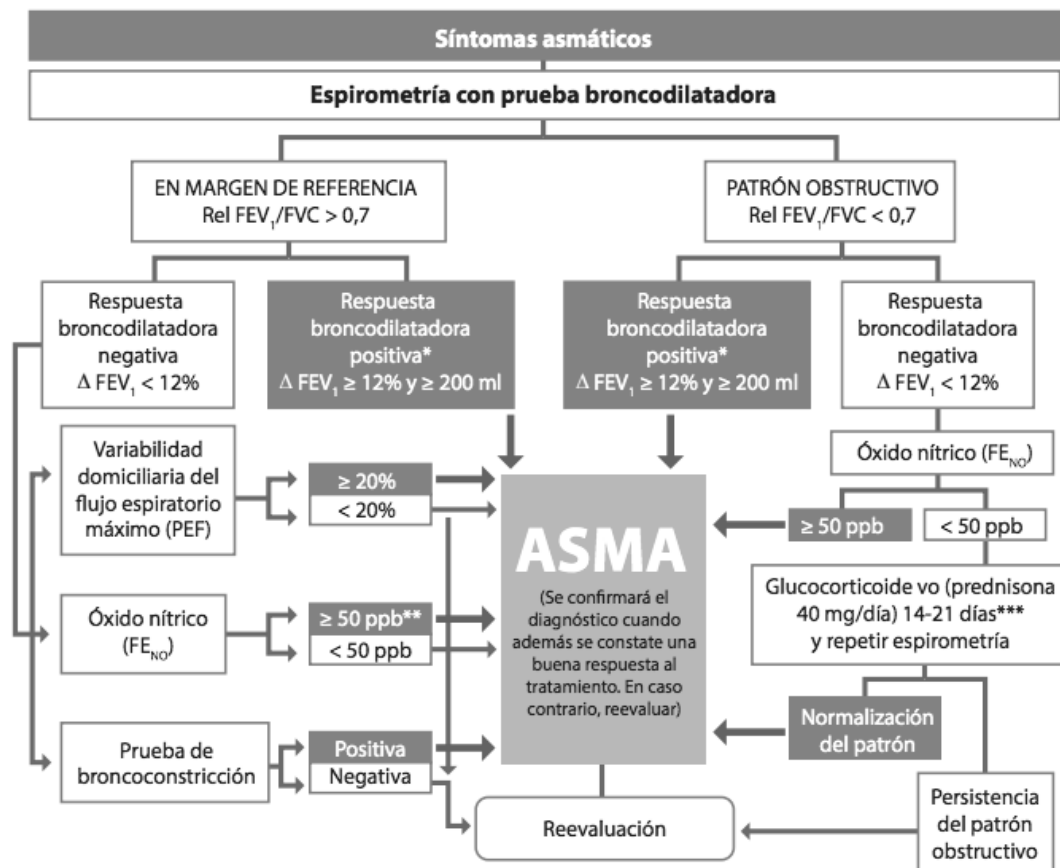


Fig. 2

TRATAMIENTO DE MANTENIMIENTO						
← Bajar Escalones terapéuticos Subir* →						
TRATAMIENTO DE MANTENIMIENTO	Escalón 1	Escalón 2	Escalón 3	Escalón 4	Escalón 5	Escalón 6
	De elección	GCI a dosis bajas	GCI a dosis bajas + LABA	GCI a dosis medias + LABA	GCI a dosis altas + LABA	GCI a dosis altas + LABA + tiotropio o ARLT o teofilina
	Otras opciones	ARLT	GCI a dosis medias GCI a dosis bajas + ARLT	GCI a dosis medias + ARLT	Si mal control añadir: - Tiotropio y/o - ARLT y/o - Teofilina Si persiste mal control considerar tratamiento por fenotipos: - Omalizumab: asma alérgica - Azitromicina: asma neutrofílica - Reducción ponderal: obesidad	Si persiste mal control considerar: - Termoplastia y/o - Triamcinolona IM o Glucocorticoides VO
	A demanda	SABA		SABA o GCI a dosis bajas + formoterol		
	Educación, control ambiental, tratamiento de la rinitis y otras comorbilidades					
Considerar inmunoterapia con alérgenos						

*tras confirmar la correcta adhesión terapéutica y empleo de inhaladores

Escalones terapéuticos de tratamiento de mantenimiento del asma del adulto,

ARLT: antagonistas de los receptores de los leucotrienos; GCI: Glucocorticoide inhalado; LABA: Agonista β_2 -adrenérgico de acción larga; saba: Agonista β_2 -adrenérgico de acción corta

Fig. 3

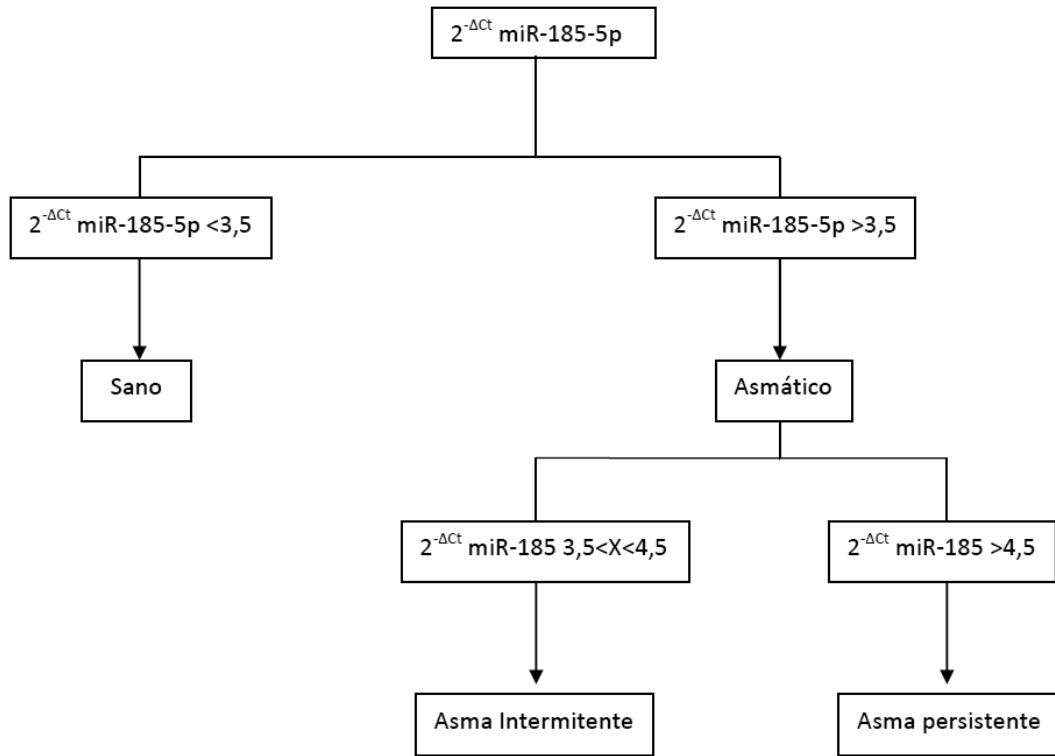


Fig. 4

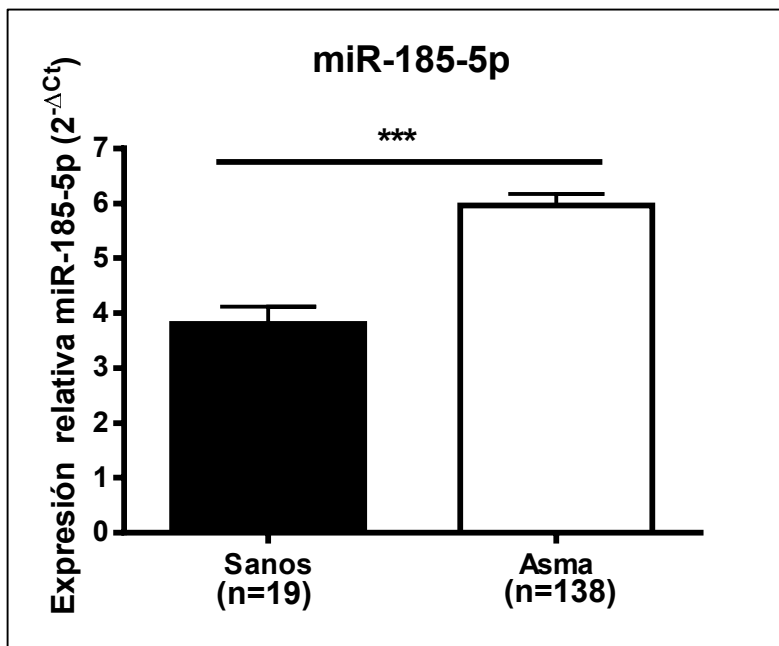


Fig. 5

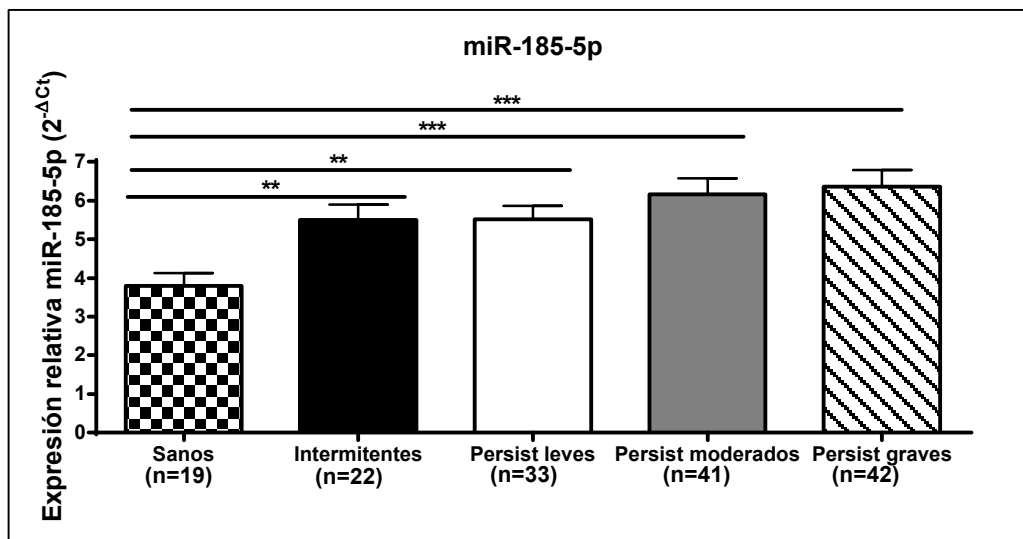


Fig. 6

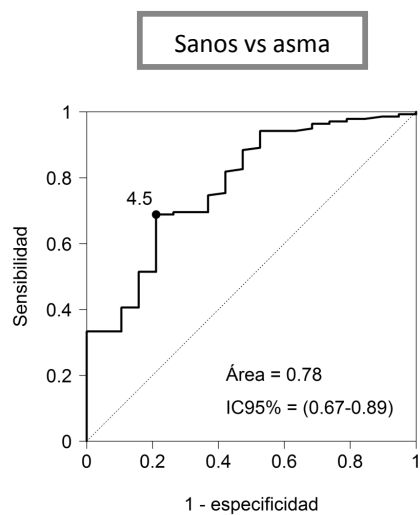


Fig. 7

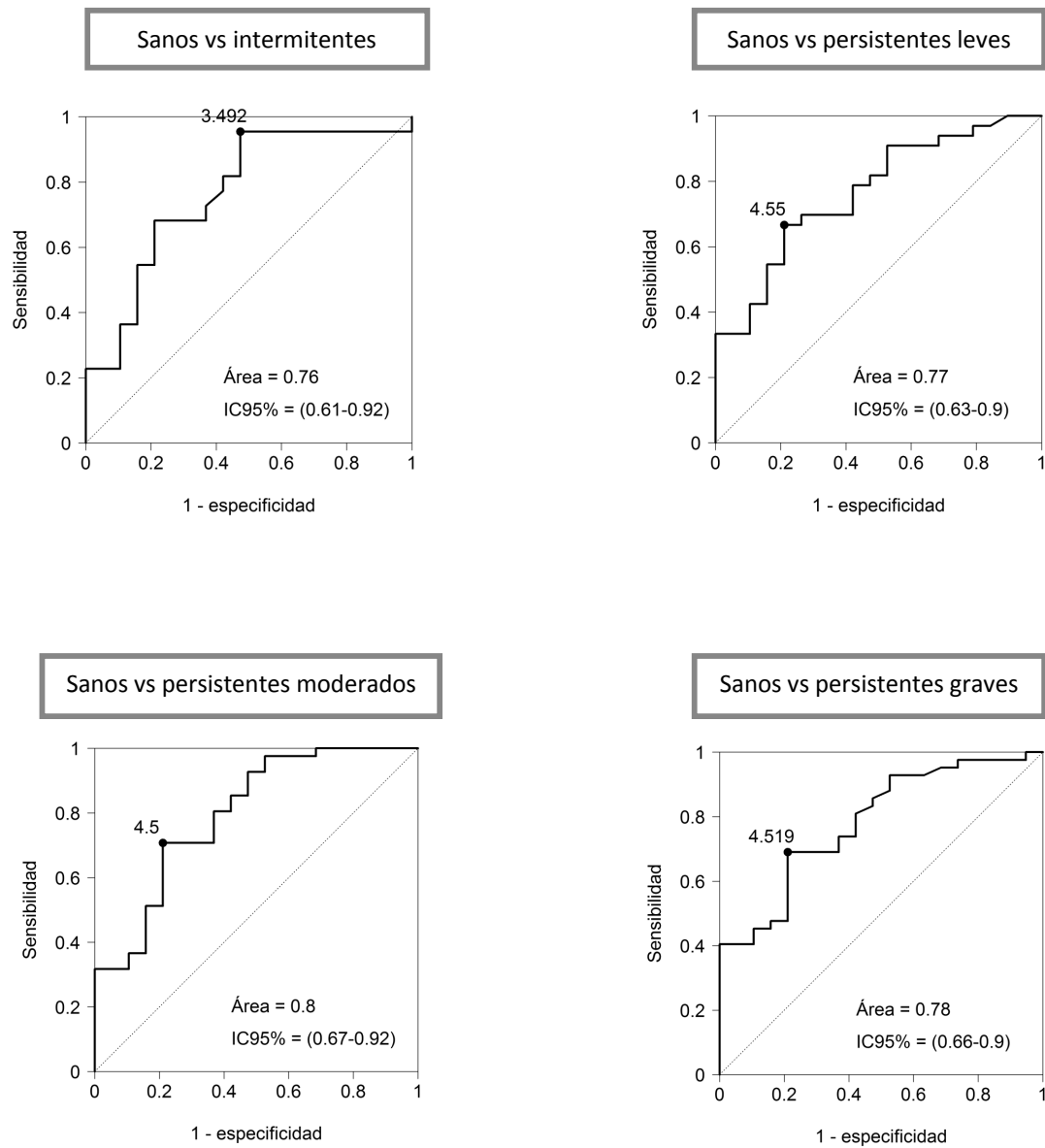
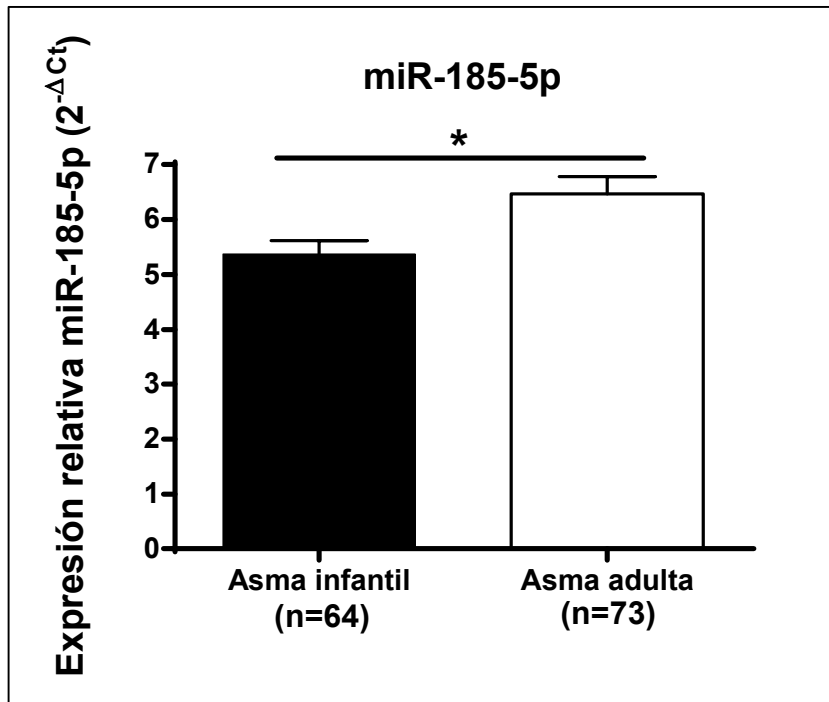


Fig. 8





- ②① N.º solicitud: 201730739
②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.05.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)
C12N15/113 (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ALEXANDROVA, E. et al. Small RNA profiling reveals deregulated phosphatase and tensin homolog (PTEN)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway in bronchial smooth muscle cells from asthmatic patients. Journal of Allergy and Clinical Immunology. Enero 2016, Vol. 137, Nº 1, páginas 58 - 67. ISSN 0091-6749 (impreso), ISSN 1097-6825 (electrónico) <DOI: 10.1016/j.jaci.2015.05.031> Especialmente epígrafe "sncRNA deregulation in asthmatic patients" (páginas 61-62); tabla 1.	1 - 9, 11 - 14
X	McGEACHIE, M. J et al. Asthma remission: Predicting future airways responsiveness using an miRNA network. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. Agosto 2017, Vol. 140, Nº 2, páginas 598 - 600. ISSN 1097-6825 (electrónico), [en línea] publicado en línea el 24.02.2017 [recuperado el 14.12.2017] Recuperado de internet: <URL:http://www.jacionline.org/article/S0091-6749(17)30313-5/fulltext> <DOI:10.1016/j.jaci.2017.01.023> Especialmente figura 1A	1 - 9, 11 - 14
X	JP 2017038553 A (UNIV CHIBA) 23/02/2017 (resumen) WPI recuperado el 14.12.2017, Recuperado de EPOQUE, DW201718, Nº acceso 2017-142249 & TXPSPJEA recuperado el 14.12.2017, recuperado de EPOQUE, especialmente párrafo [00034]	1 - 9, 11 - 14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.12.2017

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/2

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

C12Q, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, REGISTRY, HCAPLUS, EM_REL, NRNL1