

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 840**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2012 PCT/IB2012/000567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12107841**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2012 E 12720568 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2734636**

54 Título: **Biomarcadores de micro-ARN para identificar el riesgo y/o diagnosticar tumor pulmonar**

30 Prioridad:

**07.02.2011 IT MI20110174  
07.02.2011 IT MI20110173  
07.02.2011 IT MI20110172  
11.08.2011 US 201161522328 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.02.2020**

73 Titular/es:

**SOZZI, GABRIELLA (33.3%)  
Via Vivaio 4  
20122 Milan, IT;  
BOERI, MATTIA (33.3%) y  
PASTORINO, UGO (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SOZZI, GABRIELLA;  
PASTORINO, UGO y  
BOERI, MATTIA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 742 840 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**

Biomarcadores de micro-ARN para identificar el riesgo y/o diagnosticar tumor pulmonar

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para identificar y utilizar, en etapas pre-diagnósticas y/o diagnósticas, biomarcadores moleculares especiales identificables en muestras biológicas, tales como, por ejemplo, sangre total, suero, plasma, recolectados de un individuo.

Con más detalle, la invención se refiere a métodos para identificar individuos con riesgo de tumor, en particular tumor pulmonar. La invención también se refiere a métodos para determinar la presencia y/o el nivel de agresividad de un tumor, por ejemplo, un tumor pulmonar, en un individuo.

10 Antecedentes de la invención

Como es sabido, los tumores son una de las principales causas de muerte en el mundo. En particular, los tumores pulmonares son los más altos en términos de incidencia, ya que representan aproximadamente el 12% de todos los casos nuevos de cáncer y constituyen la principal causa de muerte por cáncer en el mundo, tanto en hombres como en mujeres.

15 En Europa se diagnostican alrededor de 400,000 casos nuevos por año (80% hombres, 20% mujeres). En Italia, la epidemiología del cáncer pulmonar es similar, con una incidencia de 34,000 casos por año, de los cuales 7,000 son mujeres y 27,000 hombres.

20 Lamentablemente, la incidencia y la mortalidad son muy similares debido a la naturaleza altamente letal del tumor pulmonar: la mortalidad a nivel mundial es de 27,500, de los cuales 22,000 son hombres y 5,500 mujeres. Estos datos epidemiológicos y el escaso nivel de tratabilidad de la enfermedad subrayan la importancia de identificar métodos que puedan identificar lo antes posible a cualquier sujeto que pueda estar en riesgo de desarrollar cáncer pulmonar. Además, es de gran interés desarrollar procedimientos que puedan ayudar en el correcto diagnóstico de tumores, en particular tumores pulmonares presentes en un sujeto individual bajo examinación.

25 A pesar de estas necesidades, los marcadores tumorales disponibles que hay hoy en día son para uso diagnóstico, es decir, identifican a los pacientes cuando la enfermedad ya se ha desarrollado, de modo que pueda identificarse con métodos de imagen (tomografía computarizada espiral). Sin embargo, estos marcadores son pocos y no específicos y esencialmente comprenden marcadores bioquímicos tales como la evaluación de la proteína ACE (Antígeno Carcinoembrionario) y algunas citoqueratinas como TPA, TPS y Cyfra 21.1.

30 También se conoce una prueba de proteómica (perfil de 5 proteínas) en el suero, actualmente propuesta por Vermillion Inc. y utilizada para indicar una probabilidad (con una puntuación de 1 a 10) de que las masas ováricas puedan ser de naturaleza maligna. Esta prueba se utiliza para mujeres que ya presentan masas ováricas de naturaleza no definida.

Con referencia específica a los tumores pulmonares, aunque en los últimos años se han realizado mejoras importantes en el tratamiento de pacientes oncológicos, existe la necesidad de desarrollar métodos más efectivos que puedan conducir a una intervención terapéutica más rápida en el manejo clínico de muchos tipos de tumores.

35 En la actualidad, la mayoría de los tumores pulmonares se diagnostican en una etapa tardía, cuando los síntomas son clínicamente evidentes y, por ejemplo, con referencia al carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), solamente un tercio de los pacientes con CPCNP presenta una enfermedad quirúrgicamente resecable, un enfoque que sigue siendo el tratamiento más efectivo para este tipo de tumor.

40 A pesar del progreso reciente en el tratamiento del cáncer de pulmón después de la resección y el uso de tratamientos específicos para objetivos moleculares determinados, la tasa de curación del carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) sigue siendo baja debido a la reaparición del mismo en pacientes que son resistentes a los medicamentos o que presentan metástasis.

45 La eficacia de la tomografía computarizada en espiral en la identificación de cáncer pulmonar en fumadores empedernidos se está evaluando en varios estudios clínicos aleatorizados en Europa y en Estados Unidos. Debido a su alto nivel de sensibilidad, quedan varios puntos críticos para su uso en la práctica clínica moderna, como el sobrediagnóstico de nódulos indolentes, con la consiguiente alta frecuencia de tratamientos no necesarios y la verificación del impacto efectivo sobre la mortalidad.

50 En este contexto, en los últimos años se han identificado microARN (en lo sucesivo también MiARN) como una nueva clase de marcadores biológicos circulantes que por su naturaleza parecen ser muy estables y altamente tejido-específicos (Chen X, Cell Res, 2008). Los MiARN son pequeñas moléculas de ARN no codificantes (con una longitud de 19-25 nucleótidos) que tienen una función reguladora que les permite modular la expresión de varios genes diana involucrados en varios mecanismos moleculares, entre los cuales están involucrados aquellos de los procesos de transformación.

El desarrollo de tecnologías de alto rendimiento ha permitido el estudio de la expresión global de los perfiles de miARN en cáncer (microARNoma) (Cummins JM et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2006), revelando que existen cientos de miARN cuya expresión está desregulada en tumores (Croce CM, Visone R, AJP, 2009; WO2009/070653, The Ohio State University Research Foundation).

- 5 Además de la especificidad del tejido, el miARN posee un grado de estabilidad alto, facilidad de detección y asociación con parámetros clínicos-patológicos conocidos (Lu J et al., Nature, 2005).

También se han realizado pruebas para determinar si los miARN son estables, detectables y cuantificables no solo en los tejidos (tanto congelados como fijados en formalina o parafina) sino también en los fluidos corporales. Los resultados de esta investigación han demostrado que los miARN también están presentes en la circulación sanguínea (sangre total, suero y plasma), donde se encuentran en forma estable protegidos por ARNs endógenos. Los miARN circulantes son detectables y cuantificables y los estudios que han tomado sus niveles en los fluidos biológicos de los pacientes oncológicos examinados han reportado que algunos de ellos presentan niveles desregulados con respecto a individuos sanos (Heneghan HM et al., Ann Surg, 2010; Mitchell PS et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2008; Chen X, Cell Res, 2008).

15 Publicaciones recientes reportan el perfil de miARNs que circulan en el suero y plasma de pacientes con tumor pulmonar (Hu Z, Clin Oncol, 2010; Silva J, Eur Respir J, 2010; Shen J, Lab Invest, 2010). En particular, Boeri et al., Proc Natl Acad Sci USA (2011) informan que la firma de la proporción de miARN puede clasificar a los pacientes por la presencia de tumor pulmonar, el riesgo de desarrollar tumor pulmonar, el riesgo de desarrollar un tumor pulmonar agresivo y la presencia de un tumor pulmonar agresivo.

20 A pesar de la presencia de sistemas de diagnóstico por imagen y los estudios relacionados con los microARNs, todavía existe la necesidad de identificar procedimientos que sean capaces de identificar, con cierto grado de anticipación, a individuos con riesgo de desarrollar cáncer pulmonar y que posiblemente sean capaces de predecir el desarrollo de las formas de cáncer, en particular tumor pulmonar, que son más agresivas y letales. También es necesario mejorar el grado de fiabilidad de las técnicas de diagnóstico disponibles actualmente.

25 Sumario de la invención

En esta situación, el objetivo de la presente invención es obviar una o más de las limitaciones en los procedimientos y productos conocidos.

Por lo tanto, un objetivo de la invención es proporcionar procedimientos para la determinación temprana de individuos que presentan un riesgo de desarrollar un tumor, en particular un tumor pulmonar.

30 Un objetivo adicional de la invención es hacer disponibles a procedimientos que ayuden en el diagnóstico de tumores, en particular tumores pulmonares, en sujetos humanos.

Un objetivo adicional de la invención es hacer disponibles a procedimientos que puedan establecerse fácilmente en laboratorios, analizando muestras biológicas recolectadas de un individuo.

35 Un objetivo adicional de la invención es proporcionar procedimientos que permitan obtener resultados satisfactorios utilizando muestras de sangre, suero o plasma.

Uno o más de los objetivos establecidos se logran sustancialmente mediante un método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones adjuntas.

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. En la memoria descriptiva, las formas singulares también incluyen el plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Descripción breve de las figuras

45 La Figura 1 es un esquema que muestra las características clínico-patológicas de los pacientes de los conjuntos de entrenamiento y validación seleccionados para el análisis de la expresión de miARN en muestras de plasma.

La Figura 2 es una gráfica que muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con o sin la firma de riesgo de enfermedad agresiva.

50 La Figura 3 es una gráfica que muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con o sin las firmas de presencia de enfermedad agresiva.

5 La Figura 4 es una serie de proporciones y gráficas que muestran análisis de expresión de miARN en muestras de plasma recolectadas antes del inicio y en el momento de la enfermedad. Las firmas de las proporciones de miARN y su dirección en los análisis se enumeran en las tablas. El panel A muestra la firma de miARN del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. El panel B muestra la firma de miARN del diagnóstico de cáncer de pulmón. Se muestran las curvas RDM de las muestras que pertenecen al conjunto de validación. El panel C muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con firmas de miARN de riesgo de enfermedad agresiva (REA) en muestras de plasma recolectadas 1-2 años antes de la detección por tomografía computarizada del cáncer de pulmón. El panel D muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con firmas de miARN de presencia de enfermedad agresiva (PEA) en muestras de plasma recolectadas en el momento del cáncer de pulmón detectado por TC. Los pacientes con REA o PEA positivo muestran una tasa de supervivencia significativamente peor que los pacientes con REA o PEA negativo ( $P = 0.0006$  y  $P = 0.0001$ , respectivamente).

15 La Figura 5 son dos gráficas que muestran el riesgo de manifestar un tumor pulmonar (conjunto de validación). El panel izquierdo muestra la curva RDM cuando se utilizan los 15 miARN de la Tabla I para crear las 30 proporciones de la Tabla III. El panel derecho muestra la curva RDM cuando se utilizan los 6 miARN de la Tabla Ib para crear las 9 proporciones de la Tabla IIIb.

La Figura 6 son dos gráficas que muestran el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (conjunto de validación). El panel izquierdo muestra la curva RDM cuando se utilizan los 16 miARN de la Tabla II para crear las 28 proporciones de la Tabla IV. El panel derecho muestra la curva RDM cuando se utilizan los 6 miARN de la Tabla IIb para crear las 9 proporciones de la Tabla IVb.

20 La Figura 7 es dos gráficas que muestran el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (conjunto de validación). El panel izquierdo muestra la curva RDM cuando se utilizan los 18 miARN de la Tabla V para crear las 36 proporciones de la Tabla VII. El panel derecho muestra la curva RDM cuando se utilizan los 6 miARN de la Tabla Vb para crear las 9 proporciones de la Tabla VIIb.

25 La Figura 8 es dos gráficas que muestran el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (conjunto de validación). El panel izquierdo muestra la curva RDM cuando se utilizan los 10 miARN de la Tabla VI para crear las 16 proporciones de la Tabla VIII. El panel derecho muestra la curva RDM cuando se utilizan los 6 miARN de la Tabla VIb para crear las 9 proporciones de la Tabla VIIIb.

La Figura 9 es una gráfica que muestra los niveles de expresión de mir-486-5p y mir-660 en 20 pares de tumores y de tejido pulmonar normal de los mismos pacientes.

30 La Figura 10 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de proliferación realizado en células A549-GFP transfectadas con el miARN mímico mir-486-5p y mir-660.

La Figura 11 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de migración realizado en células A549-GFP transfectadas con el miARN mímico mir-486-5p y mir-660.

35 La Figura 12 es dos gráficas que muestran las estimaciones de Kaplan-Meier de la supervivencia observada a los 5 años en el ensayo INT-IEO de detección por TC. El panel A muestra los datos ordenados según la extensión de la enfermedad: 92% para el estadio I (I.C. 95%: 70.0-97.8) y 7% para el estadio II-IV (I.C. 95%: 0.5-27.5,  $P < 0.001$ ). El panel B muestra los datos ordenados según el año de detección de TC: 77% para los cánceres de pulmón detectados en los primeros 2 años del estudio (I.C. del 95%: 53.7-89.8) y 36% para los cánceres de pulmón diagnosticados entre el tercer y el quinto año (I.C. 95%: 13.7-58.7,  $P = 0.005$ ).

40 La Figura 13 es una ilustración que muestra el análisis de agrupamiento en 24 muestras de tejido pulmonar normal utilizando miARNs expresados diferencialmente entre pacientes con tumores detectados en los primeros 2 años y los de años posteriores al cribado. El estado clínico del paciente (0 = vivo, 1 = muerto), el estadio del tumor y el año de la detección del tumor se informan en las columnas A, B y C, respectivamente.

45 La Figura 14A es un diagrama que muestra la recolección y el análisis de muestras en el conjunto de capacitación. La Figura 14B es un diagrama que muestra la recolección y el análisis de muestras en el conjunto de validación. La Figura 14C es un diagrama que muestra la recolección y el análisis de muestras en un conjunto de datos ampliado.

50 La Figura 15 es una serie de gráficas que muestran la consistencia de la medición de la expresión del miARN en muestras de plasma por PCR cuantitativa en tiempo real considerando solo los 100 miARN seleccionados para el análisis de la comparación de clases. El panel A muestra que se realizaron duplicados técnicos para dos muestras de pacientes (341 y 380) y para un grupo de control (M2). La representación gráfica se realizó trazando los primeros valores de miARN obtenidos en la abscisa (duplicado A) y los valores obtenidos en la segunda evaluación en la ordenada (duplicado B). El valor de regresión lineal muestra una buena reproducibilidad de las mediciones. El panel B muestra la correlación entre dos grupos de control diferentes. El panel C es una representación gráfica de los valores promedio de todos los coeficientes de correlación de Pearson entre grupos de control, duplicados técnicos y entre todas las muestras de pacientes (antes y en el momento de la enfermedad).

55

La Figura 16A es una gráfica que muestra el número de miARNs y la proporción de miARNs para una firma de riesgo. La Figura 16B es una gráfica que muestra el número de miARNs y la proporción de miARNs para una firma de riesgo agresivo. La Figura 16C es una gráfica que muestra el número de miARNs y la proporción de miARNs para una firma de diagnóstico. La Figura 16D es una gráfica que muestra el número de miARNs y la proporción de miARNs para una firma de enfermedad agresiva.

La Figura 17 es un diagrama de flujo que ilustra el uso de miARN y la proporción de miARN de un paciente en las firmas de riesgo, riesgo agresivo, diagnóstico y enfermedad agresiva.

#### Descripción detallada de la invención

La presente memoria descriptiva describe métodos que comprenden determinar el nivel de expresión de al menos dos miARN, o al menos seis miARN, a partir del miARN enlistado en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc en la muestra biológica de un sujeto, y comparar el nivel de expresión de dicho miARN de dicha muestra de dicho sujeto con el nivel de expresión de dicho miARN de una muestra biológica de control.

La presente memoria descriptiva divulga métodos que comprenden determinar el nivel de expresión de al menos dos miARN, o al menos seis miARN, enlistados en la Tabla Ib o Id en la muestra biológica de un sujeto, y comparar el nivel de expresión de dicho miARN a partir de dicha muestra de dicho sujeto al nivel de expresión de dicho miARN de una muestra biológica de control, en el que un cambio o una desviación en el nivel de expresión de dichos al menos dos miARN en dicha muestra biológica de dicha muestra biológica de control identifica a un sujeto en riesgo de manifestar un tumor. Preferentemente, el miARN puede ser el miARN que figura en la Tabla Ie. Preferiblemente, el tumor no puede ser detectado por tomografía computarizada en espiral.

La presente memoria descriptiva divulga métodos que comprenden determinar el nivel de expresión de al menos dos miARN, o al menos seis miARN, enlistados en la Tabla IIb o IId en la muestra biológica de un sujeto, y comparar el nivel de expresión de dicho miARN a partir de dicha muestra de dicho sujeto al nivel de expresión de dicho miARN de una muestra biológica de control, en donde un cambio o una desviación en el nivel de expresión de dichos al menos dos miARN en dicha muestra biológica de dicha muestra biológica de control, identifica a un sujeto en riesgo de manifestar un tumor agresivo. Preferentemente, el miARN puede ser el miARN que figura en las Tablas IIe, IIc o IIg.

La presente memoria descriptiva divulga métodos que comprenden determinar el nivel de expresión de al menos dos miARN, o al menos seis miARN, enlistados en la Tabla Vb o Vd en la muestra biológica de un sujeto, y comparar el nivel de expresión de dicho miARN a partir de dicha muestra de dicho sujeto al nivel de expresión de dicho miARN a partir de una muestra biológica de control, en donde un cambio o una desviación en el nivel de expresión de dichos al menos dos miARN en dicha muestra biológica de dicha muestra biológica de control determina la presencia de un tumor en dicho sujeto. Preferiblemente, el miARN puede ser el miARN enlistado en las Tablas Ve o Vf. Preferiblemente, la determinación de la presencia de dicho tumor confirma la detección mediante exploración de TC en espiral.

La presente memoria descriptiva divulga métodos que comprenden determinar el nivel de expresión de al menos dos miARN, o al menos seis miARN, enlistados en la Tabla VIb o VIc en la muestra biológica de un sujeto, y comparar el nivel de expresión de dicho miARN a partir de dicha muestra de dicho sujeto al nivel de expresión de dicho miARN de una muestra biológica de control, en donde un cambio o una desviación en el nivel de expresión de dichos al menos dos miARN en dicha muestra biológica de dicha muestra biológica de control determina la presencia de un tumor agresivo en dicho sujeto. Preferentemente, el miARN puede ser el miARN enlistado en las Tablas VIe o VIf. Preferiblemente, la determinación proporciona un pronóstico de supervivencia libre de enfermedad después de una intervención quirúrgica.

Los métodos de la presente divulgación pueden comprender además calcular una pluralidad de cocientes reales determinando una proporción entre el nivel de expresión de al menos un par de miARN de al menos dos miARN, o al menos seis miARN, enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc; comparando cada uno de los cocientes reales con un valor de control respectivo; y determinando los cocientes reales que se desvían del valor del cociente de control respectivo.

Los métodos de la presente divulgación pueden comprender además calcular una pluralidad de cocientes reales determinando una proporción entre el nivel de expresión de al menos un par de miARN de al menos dos miARN, o al menos seis miARN, enlistados en las Tablas Ib, Id, IIb, IId, Vb, Vd, VIb o VIc; comparando cada uno de los cocientes reales con un valor de control respectivo; y determinando los cocientes reales que se desvían del valor del cociente de control respectivo. Preferentemente, el miARN puede ser el miARN que se enlista en la Tabla Ie, IIe, IIc, IIg, Ve, Vf, VIe o VIf.

Los métodos de la presente divulgación pueden comprender además determinar un número o un porcentaje de cocientes reales que se desvían del valor de control respectivo.

Los métodos de la presente divulgación pueden comprender además definir como un individuo en riesgo a un individuo para quien al menos un número predeterminado o un porcentaje predeterminado de los cocientes reales se desvía con respecto al valor del cociente de control respectivo.

Para cada uno de los cocientes calculados se asocia un cociente de control respectivo, representado por una proporción de los niveles de expresión del miARN en la muestra biológica de control con respecto a una muestra biológica del mismo tipo.

5 Los métodos de la presente divulgación pueden además comprender correlacionar la desviación de un número predeterminado o un porcentaje predeterminado de niveles de expresión con respecto a los criterios de control correspondientes a una presencia o ausencia de riesgo de que el individuo pueda presentarse clínicamente con un tumor en un tiempo predeterminado

El individuo podría presentar clínicamente un tumor agresivo en un tiempo predeterminado. El tiempo predeterminado es entre uno y tres años. Preferiblemente, el tiempo predeterminado es dentro de los 28 meses.

10 El cálculo de la pluralidad de cocientes reales comprende el uso del nivel de expresión de al menos dos miARN, o al menos seis miARN, enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc. El cálculo de la pluralidad de cocientes reales comprende determinar un número predeterminado o un porcentaje predeterminado de cocientes entre los niveles de expresión, en donde los cocientes se seleccionan de al menos uno de los cocientes, al menos dos de los cocientes, al menos seis de los cocientes, como se enlistan en las Tablas IIIa, IIIc, IVa, IVc, VIIa, VIIc, VIIIa o VIIIc. Se pueden determinar al menos 20%, 30%, 50% o 100% de los cocientes reales enlistados en las Tablas IIIa, IIIc, IVa, IVc, VIIa, VIIc, VIIIa o VIIIc. Los cocientes se pueden seleccionar de los cocientes enlistados en las Tablas IIIb, IIIc, IVb, IVd, VIIb, VIIc, VIIIb o VIIIc.

15 Los métodos de la presente divulgación pueden además comprender el definir como un individuo en riesgo de un tumor, un individuo para quien al menos 20%, 30%, 50% o 100% de los cocientes reales calculados se desvían con respecto a los respectivos valores cocientes de control. El individuo está en riesgo de un tumor entre uno y tres años desde la recolección de la muestra biológica. El tumor puede ser un tumor agresivo.

Los métodos de la presente divulgación pueden además comprender el definir como un individuo que presenta un tumor, un individuo para quien al menos 20%, 30%, 50%, 60% o 100% de los cocientes reales calculados se desvían con respecto a los respectivos valores cocientes de control. El tumor puede ser un tumor agresivo.

25 El tumor es un tumor pulmonar. El tumor pulmonar puede ser cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), adenocarcinoma pulmonar (ADC), carcinoma bronquioalveolar (CBA), carcinoma de pulmón de células escamosas (CCE) o carcinoma de células grandes (CCG).

30 La muestra biológica es un fluido biológico. El fluido biológico puede ser sangre total, una fracción de sangre, plasma o suero. 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 imagen, en particular el individuo fumador que no presenta nódulos de dimensiones superiores a 5mm si se somete a una tomografía computarizada en espiral.

35 La muestra biológica de control es una muestra biológica de un sujeto libre de enfermedad. La muestra biológica de control es una muestra biológica obtenida de dicho sujeto en un momento anterior. La muestra biológica de control se obtiene de dicho sujeto hasta tres años antes del diagnóstico. La muestra biológica de control es una muestra biológica obtenida de un tejido diferente de dicho sujeto.

40 Como se utiliza en la presente memoria, un "individuo", "sujeto", "paciente" o "sujeto en necesidad del mismo" es un individuo que tiene el riesgo de desarrollar un tumor o un tumor agresivo o uno que puede tener o puede estar afectado por un tumor o tumor agresivo. Estos términos pueden ser utilizados indistintamente. Preferiblemente, el individuo es un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, primate, pájaro, ratón, rata, ave, perro, gato, vaca, caballo, cabra, camello, oveja o cerdo. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

Como se utiliza en la presente memoria, MicroARN o miARN son moléculas de ARN pequeñas, no codificantes (con una longitud de 19-25 nucleótidos). En particular, se hace referencia a el miARN presente en muestras biológicas de tejido humano, por ejemplo, sangre total, plasma, suero, saliva o condensado bronquial.

Firma de riesgo

45 La presente memoria descriptiva divulga métodos que incluyen: determinar el nivel de expresión de los seis miARN enlistados en la Tabla Ib o Id en una muestra biológica de un sujeto, y comparar el nivel de expresión de dicho miARN de dicha muestra de dicho sujeto al nivel de expresión de dicho miARN a partir de la muestra biológica de control, en donde un cambio o una desviación en el nivel de expresión de dichos al menos seis miARN en dicha muestra biológica de dicha muestra biológica de control identifica a un sujeto en riesgo de manifestar un tumor. Preferiblemente, el tumor no puede ser detectado por tomografía computarizada en espiral.

50 El método puede además incluir: calcular una pluralidad de cocientes reales al determinar una proporción entre el nivel de expresión de al menos un par de miARN a partir de al menos seis miARN enlistados en la Tabla Ib o Id; comparando cada uno de los cocientes reales con un valor de control respectivo; y determinando los cocientes reales que se desvían del valor del cociente de control respectivo.

5 La presente memoria descriptiva divulga miARNs, en particular aquellos de las Tablas la o lc adjuntas, como biomarcadores moleculares para la evaluación del riesgo de manifestar tumores pulmonares dentro de 1-3 años después la recolección de muestras de fluido biológico. La presente invención también proporciona que las proporciones entre los valores de expresión de miARN son biomarcadores moleculares ideales para la investigación sobre la evaluación del riesgo de contraer un tumor pulmonar de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico, como sangre total, suero, plasma, saliva o condensado bronquial.

10 Como se utiliza en la presente, un individuo en riesgo de tumor (agresivo o no según los estudios del caso): un individuo que en el tiempo de referencia (1-3 años) después de la recolección de la muestra biológica tiene un riesgo de más del 80% de desarrollar un tumor, por ejemplo, un tumor pulmonar, detectable utilizando técnicas como la tomografía computarizada en espiral.

15 Utilizando los niveles de expresión de los miARN enlistados en la Tabla la o lc, se identificaron las proporciones entre los valores medidos de los niveles de expresión con respecto a los pares de microARN enlistados en la Tabla IIIa o IIIc. Estas proporciones se pueden utilizar para evaluar el riesgo de contraer un tumor pulmonar dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico, dando resultados de predicción extremadamente confiables.

20 En más detalle, calculando un número suficiente de proporciones reales seleccionadas entre aquellas de la Tabla IIIa o IIIc, por ejemplo, al menos el 20% de ellas, y opcionalmente al menos el 50%, es posible observar el progreso con respecto a las proporciones de control. Un individuo se define con un alto riesgo de tumor pulmonar, que podría ser detectable por tomografía computarizada en espiral, en un período comprendido entre uno y tres años a partir de la recolección de la muestra de fluido biológico, para quien al menos el 30% de las proporciones reales calculadas se desvían con respecto al valor respectivo de la proporción de control.

Tabla la. Un conjunto de miARNs utilizado para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

miARN
hsa-miR-451
hsa-miR-320
hsa-miR-660
hsa-miR-92a
hsa-miR-106a
hsa-miR-140-5p
hsa-miR-15b
hsa-miR-17
hsa-miR-197
hsa-miR-19b
hsa-miR-221
hsa-miR-28-3p
hsa-miR-30b
hsa-miR-30c
hsa-miR-145

25 La comparación de los miARNs enlistados en la Tabla la en muestras de pacientes pre-enfermedad vs. muestras libres de enfermedad (control) mostró una sensibilidad de 83.3 (sensibilidad de entrenamiento de 85.0; sensibilidad de validación de 81.3) y una especificidad de 95.5 (especificidad de entrenamiento de 85.7; validación especificidad de 100.0).

Tabla Ib. Un conjunto de miARNs utilizado para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

miARN
hsa-miR-451
hsa-miR-320
hsa-miR-660
hsa-miR-197
hsa-miR-30b
hsa-miR-30c

5 La comparación de los miARN preferidos enlistados en la Tabla Ib en muestras de pacientes pre-enfermedad vs. muestras libres de enfermedad (control) mostró una sensibilidad de 80.6 (sensibilidad de entrenamiento de 80.0; sensibilidad de validación de 81.3) y una especificidad de 95.5 (especificidad de entrenamiento de 85.7; especificidad de validación de 100.0).

Tabla Ic. Otro conjunto de miARNs utilizado para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de líquido biológico).

miARN
hsa-miR-660
hsa-miR-451
hsa-miR-197
hsa-miR-17
hsa-miR-15b
hsa-miR-106a
hsa-miR-16
hsa-miR-92a
hsa-miR-19b
hsa-miR-101
hsa-miR-133a
hsa-miR-28-3p
hsa-miR-320
hsa-miR-126
hsa-miR-142-3p
hsa-miR-140-3p

10

Tabla Id. Otro conjunto de miARNs utilizado para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de líquido biológico).

miARN
hsa-miR-660



hsa-miR-451
hsa-miR-197
hsa-miR-17
hsa-miR-15b
hsa-miR-106q

Tabla Ie. Otro conjunto de miARNs utilizado para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de líquido biológico).

miARN
hsa-miR-660
hsa-miR-197

5 Tabla IIIa. Las proporciones entre los valores medidos de expresión de pares de miARNs utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

Pares de miARN
Q1= hsa-miR-30c/hsa-miR-660
Q2= hsa-miR-30b/hsa-miR-660
Q3= hsa-miR-197/hsa-miR-660
Q4= hsa-miR-17/hsa-miR-660
Q5= hsa-miR-28-3p/hsa-miR-660
Q6= hsa-miR-106a/hsa-miR-660
Q7= hsa-miR-15b/hsa-miR-660
Q8= hsa-miR-30c/hsa-miR-451
Q9= hsa-miR-30b/hsa-miR-451
Q10= hsa-miR-197/hsa-miR-451
Q11= hsa-miR-145/hsa-miR-660
Q12= hsa-miR-19b/hsa-miR-660
Q13= hsa-miR-17/hsa-miR-451
Q14= hsa-miR-28-3p/hsa-miR-451
Q15= hsa-miR-106a/hsa-miR-451
Q16= hsa-miR-30c/hsa-miR-320

Pares de miARN
Q17= hsa-miR-30b/hsa-miR-320
Q18= hsa-miR-197/hsa-miR-320
Q19= hsa-miR-15b/hsa-miR-451
Q20= hsa-miR-28-3p/hsa-miR-320
Q21= hsa-miR-197/hsa-miR-92a
Q22= hsa-miR-30b/hsa-miR-92a
Q23= hsa-miR-30c/hsa-miR-92a
Q24= hsa-miR-140-5p/hsa-miR-660
Q25= hsa-miR-221/hsa-miR-660
Q26= hsa-miR-19b/hsa-miR-451
Q27= hsa-miR-145/hsa-miR-451
Q28= hsa-miR-17/hsa-miR-320
Q29= hsa-miR-106a/hsa-miR-320
Q30= hsa-miR-15b/hsa-miR-320

Tabla IIIb. Las proporciones entre los valores medidos de expresión de pares de miARNs utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

Pares de miARN
hsa-miR-30b / hsa-miR-320
hsa-miR-30b / hsa-miR-451
hsa-miR-30b / hsa-miR-660
hsa-miR-197 / hsa-miR-451
hsa-miR-197 / hsa-miR-660
hsa-miR-197 / hsa-miR-320
hsa-miR-30c / hsa-miR-451
hsa-miR-30c / hsa-miR-660
hsa-miR-30c / hsa-miR-320

5

En relación con el riesgo de manifestar un tumor pulmonar, la Figura 5 muestra (en el lado izquierdo) la curva RDM cuando se utilizan los 15 miARN de la Tabla Ia para crear las 30 proporciones de la Tabla IIIa y (en el lado del extremo derecho) la curva RDM cuando se utilizan los 6 miARN de la Tabla Ib para crear las 9 proporciones de la Tabla IIIb.

Tabla IIIc: Otro conjunto de proporciones entre los valores medidos de la expresión de pares de miARNs utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar (dentro de 1-3 después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

Pares de miARN	< o >	Corte de almacenamiento 3y
Q1= hsa-miR-197/hsa-miR-660	>	3.44
Q2= hsa-miR-197/hsa-miR-92a	>	-1.72
Q3= hsa-miR-197/hsa-miR-660	>	8.63
Q4= hsa-miR-17/hsa-miR-92a	>	3.60
Q5= hsa-miR-197/hsa-miR-451	>	-2.45
Q6= hsa-miR-17/hsa-miR-451	>	2.77
Q7= hsa-miR-19/hsa-miR-660	>	7.85
Q8= hsa-miR-197/hsa-miR-19b	>	-3.96
Q9= hsa-miR-19b/hsa-miR-451	>	1.90
Q10= hsa-miR-106a/hsa-miR-660	>	8.71
Q11= hsa-miR-106a/hsa-miR-451	>	2.87
Q12= hsa-miR-106a/hsa-miR-92a	>	3.73
Q13= hsa-miR-101/hsa-miR-97	<	-4.59
Q14= hsa-miR-101/hsa-miR-17	<	-9.73
Q15= hsa-miR-133a/hsa-miR-660	>	-0.11
Q16= hsa-miR-133a/hsa-miR-451	>	-5.49
Q17= hsa-miR-101/hsa-miR-133a	<	-1,34
Q18= hsa-miR-16/hsa-miR-660	>	8.78
Q19= hsa-miR-16/hsa-miR-451	>	2.38
Q20= hsa-miR-140-3p/hsa-miR-660	>	-0.31
Q21= hsa-miR-101/hsa-miR-140-3p	<	-0.11
Q22= hsa-miR-15b/hsa-miR-451	>	-1.40
Q23= hsa-miR-15b/hsa-miR-660	>	4.77
Q24= hsa-miR-14023p/hsa-miR-15b	<	2.71
Q25= hsa-miR-126/hsa-miR-660	>	8.08
Q26= hsa-miR-28-3p/hsa-miR-660	>	3.18
Q27= hsa-miR-320/hsa-miR-660	>	6.39

- 5 Al reducir el número de microARN y las proporciones (del 27 al 1), las firmas más cortas se probaron en el conjunto de validación, analizando su potencia utilizando el porcentaje medio de clasificación correcta entre 6 métodos diferentes de análisis de predicción de clase: Predictor de covariable compuesto, Análisis discriminante lineal diagonal, 1-vecino más cercano, 3-vecinos más cercanos, centroide más cercano y máquinas de vectores de soporte. Los resultados se muestran en la Figura 16a.

Tabla III d: Otro conjunto de proporciones entre los valores medidos de expresión de pares preferidos de microARN utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

miARN
hsa-miR-197/hsa-miR-660
hsa-miR-197/hsa-miR-92a
hsa-miR-17/hsa-miR-660
hsa-miR-17/hsa-miR-92a
hsa-miR-197/hsa-miR-451
hsa-miR-17/hsa-miR-451
hsa-miR-19b/hsa-miR-660
hsa-miR-197/hsa-miR-19b
hsa-miR-19b/hsa-miR-451

- 5 Como se utiliza en la presente, las proporciones de miARN son proporciones reales determinadas mediante la realización de una relación entre los valores medidos de los niveles de expresión de pares predeterminados de moléculas de microARN.

Firma de riesgo de enfermedad agresiva

- 10 La presente memoria descriptiva divulga métodos que incluyen: determinar el nivel de expresión de los seis miARN enlistados en la Tabla II b o II d en una muestra biológica de un sujeto, y comparar el nivel de expresión de dicho miARN de dicha muestra de dicho sujeto al nivel de expresión de dicho miARN a partir de una muestra biológica de control, en el que un cambio o una desviación en el nivel de expresión de dichos al menos seis miARN en dicha muestra biológica de dicha muestra biológica de control identifica a un sujeto en riesgo de manifestar un tumor agresivo. Preferiblemente, el tumor no puede ser detectado por tomografía computarizada en espiral.

- 15 El método puede además incluir: calcular una pluralidad de cocientes reales determinando una relación entre el nivel de expresión de al menos un par de miARN a partir de al menos seis miARN enlistados en la Tabla II b o II d; comparando cada uno de los cocientes reales con un valor de control respectivo; y determinando los cocientes reales que se desvían del valor del cociente de control respectivo.

- 20 La presente memoria descriptiva divulga a los miARN, en particular a aquellos de la Tabla II a o II c adjunta, como biomarcadores para la evaluación del riesgo de contraer un tumor pulmonar agresivo dentro de 1-3 años después de la recolección de muestras de fluido biológico. Además, en este caso también, las proporciones entre los valores de expresión de miARN se identificaron específicamente como biomarcadores moleculares ideales para ser investigados para la evaluación del riesgo de contraer un tumor pulmonar agresivo dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico, que podría ser sangre total, suero, plasma, saliva o condensado bronquial.

- 25 Además, mediante el uso de los niveles de expresión de miARN de la Tabla II a o II c, se identificaron las proporciones entre los valores medidos de los niveles de expresión en relación con los pares de microARN de la Tabla IV a o IV c para evaluar el riesgo de contraer un tumor pulmonar agresivo dentro de 1-3 años después de la recolección de muestras de fluido biológico. Más detalladamente, al calcular un número suficiente de proporciones reales seleccionadas entre las proporciones de la Tabla IV a o IV c, por ejemplo, al menos el 30%, y opcionalmente al menos el 50%, se puede estudiar la progresión de las proporciones con respecto a las proporciones del control.

- 30 Un individuo se define como en riesgo de contraer un tumor pulmonar agresivo en un período comprendido entre uno y tres años después de la recolección de la muestra de fluido biológico, si en ese individuo al menos 50%, opcionalmente al menos 75%, de las proporciones reales calculadas se desvían con respecto al valor de la relación de control respectiva.

- 35 Como se utiliza en la presente, un tumor agresivo es un tumor, por ejemplo, un tumor pulmonar, con un pronóstico letal o capaz de causar la muerte en el 90% de los pacientes dentro de los cinco años posteriores al diagnóstico de la enfermedad.

El uso de las proporciones de miARN también permite predecir de manera confiable el desarrollo de un tumor pulmonar, en particular de la forma más agresiva, en individuos de alto riesgo (más de 50 años y fumadores

5 empedernidos) hasta dos años antes de que la enfermedad se presente en una etapa visible con las mejores técnicas de imagen disponibles actualmente (tomografía computarizada en espiral). Debe tenerse en cuenta también que el método que utiliza el cálculo de las proporciones, o las proporciones de miARN, descritas anteriormente, puede accionarse con una simple recolección de una muestra de sangre y, por lo tanto, es completamente no invasivo, y permite que el análisis se realice de manera rápida y económica.

Tabla IIa. Los microARNs utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de los 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

miARN
hsa-miR-660
hsa-miR-140-5p
hsa-miR-486-5p
hsa-miR-197
hsa-miR-221
hsa-miR-451
hsa-miR-28-3p
hsa-miR-148a
hsa-miR-19b
hsa-miR-15b
hsa-miR-30c
hsa-miR-30b
hsa-miR-101
hsa-miR-21
hsa-miR-140-3p
hsa-miR-142-3p

10 Al comparar los miARN enlistados en la Tabla IIa en muestras de pacientes pre-enfermedad de cáncer de pulmón agresivo vs. muestras pre-enfermedad de cáncer de pulmón indolente y muestras libres de enfermedad (control), los resultados mostraron una sensibilidad de 94.5 (sensibilidad de entrenamiento de 90.9; sensibilidad de validación de 100.0) y una especificidad de 97.6 (especificidad de entrenamiento de 100.0; especificidad de validación de 96.0).

Tabla IIb: microARN preferidos utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

miARN
hsa-miR-660
hsa-miR-486-5p
hsa-miR-221
hsa-miR-28-3p
hsa-miR-148a
hsa-miR-19b

15

La comparación de los miARNs enlistados en la Tabla IIb en muestras de pacientes pre-enfermedad de cáncer de pulmón agresivo vs. muestras pre-enfermedad de cáncer de pulmón indolente y muestras libres de enfermedad (control) mostró una sensibilidad de 94.5 (sensibilidad de entrenamiento de 90.9; sensibilidad de validación de 100.0) y una especificidad de 95.0 (especificidad de entrenamiento de 100.0; especificidad de validación de 92.0).

- 5 Tabla IIc: Otro conjunto de microARN utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

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

Tabla IIc: Otro conjunto de microARN utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

miARN
hsa-miR-21
hsa-miR-451
hsa-miR-197
hsa-miR-17
hsa-miR-15b
hsa-miR-106a

Tabla IIe: Otro conjunto de microARN preferidos utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

miARN
hsa-miR-197
hsa-miR-451

5

Tabla II f: Otro conjunto de microARN preferidos utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

miARN
hsa-miR-197
hsa-miR-101

Tabla IIg: Otro conjunto de microARNs preferidos utilizados para evaluar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

miARN
hsa-miR-197
hsa-miR-28-3p
hsa-miR-451
hsa-miR-101

10

Tabla IVa. proporciones entre los valores medidos de expresión de pares de microARNs utilizados para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

miARN
Q1=hsa-miR-221/hsa-miR-660
Q2=hsa-miR-221/hsa-miR-486-5p
Q3=hsa-miR-221/hsa-miR-451
Q4=hsa-miR-140-3p/hsa-miR-221
Q5=hsa-miR-21/hsa-miR-221
Q6=hsa-miR-101/hsa-miR-221
Q7=hsa-miR-197/hsa-miR-660
Q8=hsa-miR-197/hsa-miR-486-5p
Q9=hsa-miR-140-5p/hsa-miR-660
Q10=hsa-miR-140-5p/hsa-miR-486-5p
Q11=hsa-miR-140-5p/hsa-miR-19b
Q12=hsa-miR-142-3p/hsa-miR-660
Q13=hsa-miR-148a/hsa-miR-660

Q14=hsa-miR-148a/hsa-miR-486-5p
Q15=hsa-miR-148a/hsa-miR-19b
Q16=hsa-miR-148a/hsa-miR-451
Q17=hsa-miR-15b/hsa-miR-660
Q18=hsa-miR-15b/hsa-miR-486-5p
Q19=hsa-miR-15b/hsa-miR-19b
Q20=hsa-miR-19b/hsa-miR-221
Q21=hsa-miR-19b/hsa-miR-30c
Q22=hsa-miR-28-3/hsa-miR-660
Q23=hsa-miR-28-3/hsa-miR-486-5p
Q24=hsa-miR-30b/hsa-miR-660
Q25=hsa-miR-30b/hsa-miR-486-5p
Q26=hsa-miR-30c/hsa-miR-660
Q27=hsa-miR-30c/hsa-miR-486-5p
Q28=hsa-miR-19b/hsa-miR-28-3p

Tabla IVb. proporciones entre los valores medidos de expresión de pares de microARNs utilizados para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

Pares de miARN
hsa-miR-221/ hsa-miR-660
hsa-miR-28-3p/ hsa-miR-660
hsa-miR-19b/ hsa-miR-221
hsa-miR-19b/ hsa-miR-28-3p
hsa-miR-148a/ hsa-miR-19b
hsa-miR-148a/ hsa-miR-486-5p
hsa-miR-28-3p/ hsa-miR-486-5p
hsa-miR-221/ hsa-miR-486-5p
hsa-miR-148a/ hsa-miR-660

5 En relación con el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo, la Figura 6 muestra (en el lado izquierdo) la curva RDM cuando se utilizan los 16 miARN de la Tabla IIa para crear las 28 proporciones de la Tabla IVa y (en el extremo derecho lado) la curva RDM cuando se utilizan los 6 miARN de la Tabla IIb para crear las 9 proporciones de la Tabla IVb.

10 Tabla IVc: Otro conjunto de proporciones entre los valores medidos de expresión de pares de microARNs utilizados para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).



ES 2 742 840 T3

Pares de miARN	< o >	Corte de almacenamiento 3y
Q1=hsa-miR-101/hsa-miR-197	<	-4,51
Q2=hsa-miR-197/hsa-miR-451	>	-2,07
Q3=hsa-miR-101/hsa-miR-28-3p	<	-4,42
Q4=hsa-miR-28-3p/hsa-miR-451	>	-2,36
Q5=hsa-miR-197/hsa-miR-21	>	-0,38
Q6=hsa-miR-21/hsa-miR-28-3p	<	0,78
Q7=hsa-miR-101/hsa-miR-106a	<	-9,85
Q8=hsa-miR-106a/hsa-miR-451	>	3,14
Q9=hsa-miR-106a/hsa-miR-21	>	4,81
Q10=hsa-miR-16/hsa-miR-28-3p	<	4,72
Q11=hsa-miR-16/hsa-miR-197	<	4,56
Q12=hsa-miR-106a/hsa-miR-16	>	0,66
Q13=hsa-miR-101/hsa-miR-17	<	-9,74
Q14=hsa-miR-17/hsa-miR-451	>	3,04
Q15=hsa-miR-17/hsa-miR-21	>	4,67
Q16=hsa-miR-16/hsa-miR-17	<	-0,56
Q17=hsa-miR-28-3p/hsa-miR-92a	>	-1,6
Q18=hsa-miR-197/hsa-miR-92a	>	-1,36
Q19=hsa-miR-197/hsa-miR-30c	>	-1,51
Q20=hsa-miR-28-3p/hsa-miR-30c	>	-1,79
Q21=hsa-miR-320/hsa-miR-92a	>	1,42
Q22=hsa-miR-320/hsa-miR-451	>	0,66
Q23=hsa-miR-221/hsa-miR-451	>	-0,2
Q24=hsa-miR-21/hsa-miR-221	<	-1,33
Q25=hsa-miR-145/hsa-miR-197	<	-0,96
Q26=hsa-miR-145/hsa-miR-28-3p	<	-0,69

Pares de miARN	< o >	Corte de almacenamiento 3y
Q27=hsa-miR-28-3p/hsa-miR-30b	>	-3,47
Q28=hsa-miR-197/ hsa-miR-30b	>	-3,2
Q29=hsa-miR-19b/ hsa-miR-451	>	2,19
Q30=hsa-miR-126/ hsa-miR-451	>	2,24
Q31=hsa-miR-15b/ hsa-miR-451	>	-1,2
Q32=hsa-miR-148a/ hsa-miR-197	<	-3,38
Q33=hsa-miR-140-3p/ hsa-miR-451	>	-6,81

5 Al reducir el número de microARNs y proporciones (del 33 al 1), las firmas más cortas se probaron en el conjunto de validación, analizando su poder utilizando el porcentaje medio de clasificación correcta entre 6 métodos diferentes de análisis de predicción de clase: Predictor de covariable compuesto, Análisis discriminante lineal diagonal, 1-vecino más cercano, 3-vecinos más cercanos, centroide más cercano y máquinas de vectores de soporte. Los resultados se muestran en la Figura 16b.

Tabla IVd: Otro conjunto de proporciones entre los valores medidos de expresión de pares preferidos de microARNs utilizados para determinar el riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo (dentro de 1-3 años después de la recolección de la muestra de fluido biológico).

Pares de miARN
hsa-miR-101/hsa-miR-197
hsa-miR-197/hsa-miR-451
hsa-miR-101/hsa-miR-28-3p
hsa-miR-28-3p/hsa-miR-451
hsa-miR-197/hsa-miR-21
hsa-miR-21/hsa-miR-28-3p
hsa-miR-101/hsa-miR-106a
hsa-miR-106a/hsa-miR-451
hsa-miR-106a/hsa-miR-21

10

Firma de diagnóstico

15 La presente memoria descriptiva divulga un método que incluye: determinar el nivel de expresión de los seis miARN enlistados en la Tabla Vb o Vd en una muestra biológica de un sujeto, y comparar el nivel de expresión de dicho miARN de dicha muestra de dicho sujeto a el nivel de expresión de dicho miARN a partir de una muestra biológica de control, en el que un cambio o desviación en el nivel de expresión de dichos al menos seis miARN en dicha muestra biológica de dicha muestra biológica de control determina la presencia de un tumor en dicho sujeto. Preferiblemente, la determinación de la presencia de dicho tumor confirma la detección mediante exploración por tomografía computarizada en espiral.

20 El método puede además incluir: calcular una pluralidad de cocientes reales determinando una relación entre el nivel de expresión de al menos un par de miARN a partir de al menos seis miARN enlistados en la Tabla Vb o Vd; comparando cada uno de los cocientes reales con un valor de control respectivo; y determinar los cocientes reales que se desvían del valor del cociente del control respectivo.

La presente memoria descriptiva divulga miARNs, y en particular a aquellos enlistados en la Tabla Va o Vc, que tienen un papel como marcadores biomoleculares para determinar la presencia real de un tumor pulmonar en un individuo, con fines de diagnóstico.

5 La presente memoria descriptiva también divulga que las proporciones entre los valores del nivel de expresión de los pares de miARN son biomarcadores válidos con una función de diagnóstico y pronóstico. En detalle, los miARN de la Tabla Va o Vc se utilizaron para determinar las proporciones de la Tabla VIIa o VIIc que representan las proporciones entre los valores medidos de los niveles de expresión de pares de microARN relativos y que se utilizan para determinar la presencia real (diagnóstico) de un tumor pulmonar en un individuo. Con más detalle, al calcular al menos el 20% de las proporciones reales de la Tabla VIIa o VIIc, es posible definir que el individuo presenta un tumor pulmonar si al menos el 30% de las proporciones reales (como en la Tabla VIIa o VIIc) calculadas se desvían de el valor de control respectivo.

Tabla Va: microARN utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar en un individuo.

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

15 La comparación de los miARN enlistados en la Tabla Va en el plasma de pacientes en cirugía vs. muestras libres de enfermedad (control) mostró una sensibilidad de 80.5 (sensibilidad de entrenamiento de 84.2; sensibilidad de validación de 76.5) y una especificidad de 95.5 (especificidad de entrenamiento de 100.0; especificidad de validación de 93.3).

Tabla Vb: microARNs preferidos utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar en un individuo.

miARN
hsa-miR-106a
hsa-miR-17
hsa-miR-660

hsa-miR-92a
hsa-miR-451
hsa-miR-197

5 La comparación de los miARN enlistados en la Tabla Vb en el plasma de pacientes en cirugía vs. muestras libres de enfermedad (control) mostró una sensibilidad de 77.8 (sensibilidad de entrenamiento de 84.2; sensibilidad de validación de 70.6) y una especificidad de 90.9 (especificidad de entrenamiento de 85.7; especificidad de validación de 93.3).

Tabla Vc: otro conjunto de microARNs utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar en un individuo

miARN
hsa-miR-660
hsa-miR-197
hsa-miR-17
hsa-miR-106a
hsa-miR-142-3p
hsa-miR-92a
hsa-miR-19b
hsa-miR-101
hsa-miR-145
hsa-miR-28-3p
hsa-miR-320
hsa-miR-126
hsa-miR-140-5p
hsa-miR-148

10 Tabla Vd: Otro conjunto de microARNs preferidos utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar en un individuo.

miARN
hsa-miR-660
hsa-miR-197
hsa-miR-17
hsa-miR-106a
hsa-miR-142-3p
hsa-miR-92a

Tabla Ve: Otro conjunto de microARNs preferidos utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar en un individuo.

miARN
hsa-miR-660
hsa-miR-197

Tabla Vf: Otro conjunto de microARNs preferidos utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar en un individuo.

miARN
hsa-miR-197
hsa-miR-106a
hsa-miR-660
hsa-miR-92a

5 Tabla VIIa. proporciones entre los valores medidos de expresión de pares de microARNs utilizados para determinar la presencia real de tumor pulmonar en un individuo.

Pares de miARN
Q1=hsa-miR-17/hsa-miR-451
Q2=hsa-miR-106a/hsa-miR-451
Q3=hsa-miR-133a/hsa-miR-451
Q4=hsa-miR-17/hsa-miR-660
Q5=hsa-miR-106a/hsa-miR-660
Q6=hsa-miR-197/hsa-miR-451
Q7=hsa-miR-133a/hsa-miR-660
Q8=hsa-miR-145/hsa-miR-451
Q9=hsa-miR-28-3p/hsa-miR-451
Q10=hsa-miR-17/hsa-miR-92a
Q11=hsa-miR-106a/hsa-miR-92a
Q12=hsa-miR-197/hsa-miR-660
Q13=hsa-miR-133a/hsa-miR-92a
Q14=hsa-miR-145/hsa-miR-660
Q15=hsa-miR-28-3p/hsa-miR-660
Q16=hsa-miR-15b/hsa-miR-451
Q17=hsa-miR-19b/hsa-miR-451
Q18=hsa-miR-30b/hsa-miR-451
Q19=hsa-miR-17/hsa-miR-320
Q20=hsa-miR-106a/hsa-miR-320
Q21=hsa-miR-17/hsa-miR-21

Q22=hsa-miR-106a/hsa-miR-21
Q23=hsa-miR-197/hsa-miR-92a
Q24=hsa-miR-101/hsa-miR-106a
Q25=hsa-miR-133a/hsa-miR-320
Q26=hsa-miR-101/hsa-miR-17
Q27=hsa-miR-145/hsa-miR-92a
Q28=hsa-miR-28-3p/hsa-miR-92a
Q29=hsa-miR-106a/hsa-miR-140-3p
Q30=hsa-miR-15b/hsa-miR-660
Q31=hsa-miR-19b/hsa-miR-660
Q32=hsa-miR-30b/hsa-miR-660
Q33=hsa-miR-126/hsa-miR-451
Q34=hsa-miR-140-5p/hsa-miR-451
Q35=hsa-miR-133a/hsa-miR-21
Q36=hsa-miR-140-3p/hsa-miR-17

Tabla VIIb: proporciones entre los valores medidos de expresión de pares preferidos de microARNs utilizados para determinar la presencia real de tumor pulmonar en un individuo.

Pares de miARN
hsa-miR-106a/hsa-miR-660
hsa-miR-106a/hsa-miR-92a
hsa-miR-106a/hsa-miR-451
hsa-miR-17/hsa-miR-451
hsa-miR-17/hsa-miR-660
hsa-miR-17/hsa-miR-92a
hsa-miR-197/hsa-miR-451
hsa-miR-197/hsa-miR-92a
hsa-miR-197/hsa-miR-660

5 En relación con la determinación de la presencia real de un tumor pulmonar en un individuo, la Figura 7 muestra (en el lado izquierdo) la curva RDM cuando se utilizan los 18 miARN de la Tabla Va para crear las 36 proporciones de la Tabla VIIa y (en el lado del extremo derecho) la curva RDM cuando se utilizan los 6 miARN de la Tabla Vb para crear las 9 proporciones de la Tabla VIIb.

10 Tabla VIIc: Otro conjunto de proporciones entre los valores medidos de expresión de pares de microARN utilizados para determinar la presencia real de tumor pulmonar en un individuo.

Pares de miARN	< o >	Corte de almacenamiento 3y
Q1=hsa-miR-197/hsa-miR-660	>	3,58

ES 2 742 840 T3

Pares de miARN	< o >	Corte de almacenamiento 3y
Q2=hsa-miR-197/ hsa-miR-92a	>	-1,5
Q3=hsa-miR-106a/ hsa-miR-92a	>	3,73
Q4=hsa-miR-106a/ hsa-miR-660	>	8,87
Q5=hsa-miR-106a/ hsa-miR-197	<	4,97
Q6=hsa-miR-142-3p/ hsa-miR-197	<	3,73
Q7=hsa-miR-140-5p/ hsa-miR-197	<	-0,03
Q8=hsa-miR-142-3p/ hsa-miR-28-3p	<	4,19
Q9=hsa-miR-140-5p/ hsa-miR-28-3p	<	0,33
Q10=hsa-miR-28-3p/ hsa-miR-660	>	3,18
Q11=hsa-miR-28-3p/ hsa-miR-92a	>	-1,79
Q12=hsa-miR-17/ hsa-miR-660	>	8,63
Q13=hsa-miR-17/ hsa-miR-92a	>	3,6
Q14=hsa-miR-142-3p/ hsa-miR-145	<	3,94
Q15=hsa-miR-145/ hsa-miR-660	>	3,76
Q16=hsa-miR-145/ hsa-miR-92a	>	-1,35
Q17=hsa-miR-197/ hsa-miR-320	>	-2,45
Q18=hsa-miR-106a/ hsa-miR-320	>	2,79
Q19=hsa-miR-17/ hsa-miR-320	>	2,64
Q20=hsa-miR-148a/ hsa-miR-92a	>	-4,41
Q21=hsa-miR-148a/ hsa-miR-660	>	0,76
Q22=hsa-miR-19b/ hsa-miR-660	>	7,95
Q23=hsa-miR-19b/ hsa-miR-92a	>	2,75
Q24=hsa-miR-101/ hsa-miR-660	>	-0,08
Q25=hsa-miR-101/ hsa-miR-92a	>	-5,18
Q26=hsa-miR-126/ hsa-miR-660	>	8,08
Q27=hsa-miR-126/ hsa-miR-92a	>	3,05

5 Al reducir el número de microARN y proporciones (del 27 al 1), las firmas más cortas se probaron en el conjunto de validación, analizando su potencia utilizando el porcentaje medio de clasificación correcta entre 6 métodos diferentes de análisis de predicción de clase: Predictor de covariable compuesto, Análisis discriminante lineal diagonal, 1-vecino más cercano, 3-vecinos más cercanos, centroide más cercano y máquinas de vectores de soporte. Los resultados se muestran en la Figura 16c.

Tabla VIII: Otro conjunto de proporciones entre los valores medidos de expresión de pares preferidos de microARNs utilizados para determinar la presencia real de tumor pulmonar en un individuo.

Pares de miARN
hsa-miR-197/hsa-miR-660
hsa-miR-197/ hsa-miR-92a
hsa-miR-106a/ hsa-miR-92a
hsa-miR-106a/ hsa-miR-660
hsa-miR-106a/ hsa-miR-197
hsa-miR-142-3p/ hsa-miR-197
hsa-miR-140-5p/ hsa-miR-197
hsa-miR-142-3p/ hsa-miR-28-3p
hsa-miR-140-5p/ hsa-miR-28-3p
hsa-miR-28-3p/ hsa-miR-660
hsa-miR-28-3p/ hsa-miR-92a

Firma de la presencia de enfermedad agresiva

10 La presente memoria descriptiva divulga un método que incluye: determinar el nivel de expresión de los seis miARN enlistados en la Tabla VIb o VI d en la muestra biológica de un sujeto, y comparar el nivel de expresión de dicho miARN de dicha muestra de dicho sujeto a el nivel de expresión de dicho miARN a partir de una muestra biológica de control, en el que un cambio o una desviación en el nivel de expresión de dichos al menos seis miARN en dicha muestra biológica de dicha muestra biológica de control determina la presencia de un tumor agresivo en dicho sujeto.  
 15 Preferiblemente, la determinación proporciona un pronóstico de supervivencia libre de enfermedad después de una intervención quirúrgica.

20 El método puede además incluir: calcular una pluralidad de cocientes reales determinando una relación entre el nivel de expresión de al menos un par de miARN a partir de al menos seis miARN enlistados en la Tabla VIb o VI d; comparando cada uno de los cocientes reales con un valor de control respectivo; y determinar los cocientes reales que se desvían del valor del cociente de control respectivo.

25 La presente memoria descriptiva divulga miARNs, y en particular a aquellos enlistados en la Tabla VIa o VIc, que pueden utilizarse como marcadores biomoleculares para determinar la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo (pronóstico). La presente memoria descriptiva demuestra en particular que las proporciones entre los valores de los niveles de expresión de los pares de miARN son biomarcadores válidos con una función de diagnóstico y pronóstico incluso en el caso de un tumor agresivo.

30 En detalle, los miARNs de las Tablas VIa y VIc se utilizaron para determinar las proporciones de las Tablas VIIIa y VIIIc donde hay una lista de proporciones entre los valores medidos de los niveles de expresión en relación con los pares de microARN de las Tablas VIa y VIc utilizadas para determinar la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo. En detalle, al detectar al menos el 20% de las proporciones reales de las Tablas VIIIa y VIIIc, es posible definir a un individuo que tiene un tumor pulmonar agresivo como aquel en el que al menos el 60% de las proporciones reales que se han calculado se desvían con respecto al valor de control respectivo.



Por lo tanto, el uso del procedimiento descrito puede ayudar también a resolver el problema del sobrediagnóstico y el sobretratamiento en pacientes que no están en riesgo.

5 En mayor detalle, en un contexto de vigilancia de la enfermedad utilizando tomografía computarizada en espiral, el uso de una prueba basada en este método podría permitir la selección de solo un subgrupo de pacientes con un alto riesgo de desarrollar la enfermedad para mantenerse posteriormente bajo un control más estricto. Además, la capacidad de la prueba para predecir a los pacientes que desarrollarán una enfermedad más agresiva, a menudo no diagnosticada por la tomografía computarizada, permite dirigir a estas personas directamente a programas farmacológicos específicos (incluyendo dejar de fumar) y/o el uso de exámenes de diagnóstico más específicas basadas en las características biológicas metabólicas, como PET con varios trazadores o la resonancia magnética corporal, o un tratamiento local diferente, como la radioterapia estereotáxica u otros tratamientos adicionales. El uso de las proporciones de miARN es un método de fácil aplicación con un potencial uso clínico actual y que evita el uso de análisis más profundos y complejos.

Tabla VIa: microARNs utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo.

miARN
hsa-miR-142-3p
hsa-miR-148a
hsa-miR-15b
hsa-miR-21
hsa-miR-221
hsa-miR-660
hsa-miR-19b
hsa-miR-486-5p
hsa-miR-30b
hsa-miR-16

15 La comparación de los miARNs enlistados en la Tabla VIa en muestras de pacientes de cáncer de pulmón agresivo vs. muestras pre-enfermedad de cáncer de pulmón indolente y muestras libres de enfermedad (control) mostró una sensibilidad de 86.7 (sensibilidad de entrenamiento de 80.0; sensibilidad de validación de 100.0) y una especificidad de 93.2 (especificidad de entrenamiento de 94.0; especificidad de validación de 92.6).

20 Tabla VIb: microARNs preferidos utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo.

miARN
hsa-miR-142-3p
hsa-miR-21
hsa-miR-221
hsa-miR-660
hsa-miR-19b
hsa-miR-486-5p

25 La comparación de los miARN enlistados en la Tabla VIb en muestras de pacientes de cáncer de pulmón agresivo vs. muestras pre-enfermedad de cáncer de pulmón indolente y muestras libres de enfermedad (control) mostró una sensibilidad de 80.0 (sensibilidad de entrenamiento de 80.0; sensibilidad de validación de 80.0) y una especificidad de 93.2 (especificidad de entrenamiento de 94.0; especificidad de validación de 92.6).

Tabla VIc: Otro conjunto de microARNs utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo.

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

5

Tabla VIId: Otro conjunto de microARNs utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo.

miARN
hsa-miR-660
hsa-miR-197
hsa-miR-17
hsa-miR-106a
hsa-miR-142-3p
hsa-miR-92a

Tabla VIe: Otro conjunto de microARNs preferidos utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo.

miARN
hsa-miR-451
hsa-miR-197

Tabla VI: Otro conjunto de microARNs preferidos utilizados para determinar la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo.

miARN
hsa-miR-197
hsa-miR-486-5p
hsa-miR-451

5 Tabla VIIIa: proporciones entre los valores medidos de expresión de pares de microARNs utilizados para determinar la presencia real de tumor pulmonar agresivo en un individuo.

Pares de miARN
Q1=hsa-miR-142-3p/hsa-miR-486-5p
Q2=hsa-miR-21/hsa-miR-486-5p
Q3=hsa-miR-221/hsa-miR-486-5p
Q4=hsa-miR-19b/hsa-miR-21
Q5=hsa-miR-19b/hsa-miR-221
Q6=hsa-miR-142-3p/hsa-miR-19b
Q7=hsa-miR-148a/hsa-miR-486-5p
Q8=hsa-miR-15b/hsa-miR-486-5p
Q9=hsa-miR-30b/hsa-miR-486-5p
Q10=hsa-miR-142-3p/hsa-miR-660
Q11=hsa-miR-221/hsa-miR-660
Q12=hsa-miR-148a/hsa-miR-19b
Q13=hsa-miR-15b/hsa-miR-19b
Q14=hsa-miR-19b/hsa-miR-30b
Q15=hsa-miR-16/hsa-miR-486-5p
Q16=hsa-miR-21/hsa-miR-660

Tabla VIIIb: proporciones entre los valores medidos de expresión de pares de microARNs utilizados para determinar la presencia real de tumor pulmonar agresivo en un individuo.

Pares de miARN
Q1=hsa-miR-142-3p/hsa-miR-660
hsa-miR-142-3p/hsa-miR-19b
hsa-miR-21/hsa-miR-660
hsa-miR-221/hsa-miR-660
hsa-miR-19b/hsa-miR-21
hsa-miR-19b/hsa-miR-221
hsa-miR-142-3p/hsa-miR-486-5p
hsa-miR-221/hsa-miR-486-5p
hsa-miR-21/hsa-miR-486-5p

5 En relación con la determinación de la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo, la Figura 8 muestra (en el lado izquierdo) la curva RDM cuando se utilizan los 10 miARN de la Tabla VIa para crear las 16 proporciones de la Tabla VIIIa y (en el lado del extremo derecho) la curva RDM cuando se utilizan los 6 miARN de la Tabla VIb para crear las 9 proporciones de la Tabla VIIIb.

Tabla VIIIc: Otro conjunto de proporciones entre los valores medidos de expresión de pares de microARNs utilizados para determinar la presencia real de tumor pulmonar agresivo en un individuo.

Pares de miARN	< o >	Corte de almacenamiento 3y
Q1=hsa-miR-197/ hsa-miR-451	>	-1,76
Q2=hsa-miR-197/ hsa-miR-486-5p	>	-1,65
Q3=hsa-miR-106a/ hsa-miR-197	<	4,9
Q4=hsa-miR-106a/ hsa-miR-486-5p	>	3,59
Q5=hsa-miR-106a/ hsa-miR-451	>	3,14
Q6=hsa-miR-17/ hsa-miR-197	<	4,79
Q7=hsa-miR-17/ hsa-miR-486-5p	>	3,49
Q8=hsa-miR-17/ hsa-miR-451	>	3,21
Q9=hsa-miR-126/ hsa-miR-197	<	4,17
Q10=hsa-miR-126/ hsa-miR-486-5p	>	2,75
Q11=hsa-miR-126/ hsa-miR-451	>	2,58
Q12=hsa-miR-197/ hsa-miR-660	>	4,59
Q13=hsa-miR-126/ hsa-miR-660	>	8,46

Pares de miARN	< o >	Corte de almacenamiento 3y
Q14=hsa-miR-28-3p/ hsa-miR-660	>	3,53
Q15=hsa-miR-28-3p/ hsa-miR-486-5p	>	-2,41
Q16=hsa-miR-28-3p/ hsa-miR-451	>	-2,36
Q17=hsa-miR-197/ hsa-miR-19b	>	-3,97
Q18=hsa-miR-19b/ hsa-miR-486-5p	>	2,41
Q19=hsa-miR-19b/ hsa-miR-660	>	8,42
Q20=hsa-miR-19b/ hsa-miR-451	>	2,19
Q21=hsa-miR-140-5p/ hsa-miR-197	<	-0,52
Q22=hsa-miR-140-5p/ hsa-miR-28-3p	<	0,28
Q23=hsa-miR-16/ hsa-miR-197	<	4,48
Q24=hsa-miR-197/ hsa-miR-92a	>	-1,14
Q25=hsa-miR-101/ hsa-miR-197	<	-4,51
Q26=hsa-miR-145/ hsa-miR-451	>	-2
Q27=hsa-miR-148a/ hsa-miR-451	>	-4,77
Q28=hsa-miR-142-3p/ hsa-miR-197	<	3
Q29=hsa-miR-30b/ hsa-miR-451	>	1,2
Q30=hsa-miR-15b/ hsa-miR-451	>	-1,2
Q31=hsa-miR-30c/ hsa-miR-451	>	-0,3
Q32=hsa-miR-197/ hsa-miR-21	>	-0,21

5 Al reducir el número de microARNs y proporciones (del 32 al 1), las firmas más cortas se probaron en el conjunto de validación, analizando su potencia utilizando el porcentaje medio de clasificación correcta entre 6 métodos diferentes de análisis de predicción de clase: Compuesto Predictor de covariables, análisis discriminante lineal diagonal, 1 vecino más cercano, 3 vecinos más cercanos, centroide más cercano y máquinas de vectores de soporte. Los resultados se muestran en la Figura 16d.

Tabla VIIIId: Otro conjunto de proporciones entre los valores medidos de expresión de pares preferidos de microARNs utilizados para determinar la presencia real de tumor pulmonar agresivo en un individuo.

Pares de miARN
hsa-miR-197/hsa-miR-451
hsa-miR-197/hsa-miR-486-5p

hsa-miR-106a/hsa-miR-197
hsa-miR-106a/hsa-miR-486-5p
hsa-miR-106a/hsa-miR-451
hsa-miR-17/hsa-miR-197
hsa-miR-17/hsa-miR-486-5p
hsa-miR-17/hsa-miR-451
hsa-miR-126/hsa-miR-197
hsa-miR-126/hsa-miR-486-5p
hsa-miR-126/hsa-miR-451

Una vez que se obtiene el perfil de miARN del sujeto, es necesario determinar para cada proporción si el valor excede un valor de corte predeterminado. Los resultados del conjunto de capacitación y validación muestran que, para las firmas de riesgo y diagnóstico, descritas anteriormente en las Tablas IIIc y VIIc, respectivamente, al menos el 30% (por ejemplo, aproximadamente 10 de 27) de las proporciones deben exceder el límite para considerar al sujeto positivo para la prueba. Para las dos firmas de agresividad, descritas anteriormente en las Tablas IVc y VIIIc, respectivamente, al menos el 50% (por ejemplo, 17 de 33 y 17 de 32) de las proporciones deben exceder el límite para considerar al paciente positivo para la firma de riesgo agresivo y presencia de enfermedad agresiva, respectivamente. Al reducir el número de miARNs que componen la firma, el porcentaje de proporciones positivas debe ser el mismo. Los valores de corte se obtuvieron con el conjunto de validación de muestras almacenadas durante casi 3 años, y los valores se muestran en las Tablas IIIc, IVc, VIIc y VIIIc.

Si se determina que un sujeto es positivo para más de una firma, se considera a la más crítica en este orden: riesgo, diagnóstico (ambos de bajo riesgo), riesgo de enfermedad agresiva, presencia de enfermedad agresiva (ambos de alto riesgo). Se muestra un diagrama de flujo en la Figura 17.

15 Composiciones y métodos de tratamiento

El método puede además comprender alterar el nivel de expresión de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, para lo cual el nivel de expresión cambia o se desvía, reduciendo o eliminando así el riesgo de desarrollar un tumor en dicho sujeto. El método puede comprender además alterar el nivel de expresión de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, para los cuales el nivel de expresión cambia o se desvía, reduciendo o eliminando así el riesgo de desarrollar un tumor agresivo en dicho sujeto. El método puede comprender además alterar el nivel de expresión de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, para lo cual el nivel de expresión cambia o se desvía, tratando así un tumor en dicho sujeto. El método puede comprender además alterar el nivel de expresión de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, para lo cual el nivel de expresión cambia o se desvía, tratando así un tumor agresivo en dicho sujeto.

25 Preferiblemente, alterar el nivel de expresión de dicho al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc, o un miARN mimético sintetizado químicamente o recombinante del mismo, si el nivel de expresión de dicho al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, es inferior al nivel de control de expresión o administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto capaz de inhibir la expresión de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc, si el nivel de expresión de dichos al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, es mayor que el nivel de expresión de control.

35 El método puede comprender aumentar el nivel de expresión de dicho al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, que se subexpresa con respecto al nivel de expresión del control. El método puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc, o un miARN mimético sintetizado químicamente o recombinante del mismo. El método puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN enlistados en las Tablas Ib, Id, IIb, IIc, Vb, Vd, VIb o VIc, o un miARN mimético sintetizado químicamente o recombinante del mismo. El método puede comprender disminuir el nivel de expresión de dicho al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, que se sobreexpresa con respecto al nivel de expresión del control. El método puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende a

- un inhibidor de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc. El método puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende a un inhibidor de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN enlistados en las Tablas Ib, Id, IIb, IIc, Vb, Vd, VIb o VIc. El inhibidor puede comprender ARN de doble filamento, ARN de interferencia (ARNic), ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos anti-ARNm (OAM), moléculas de ARN enzimático o ribozimas.
- 5 La presente memoria descriptiva también divulga un compuesto farmacéutico que comprende al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc, miARN mimético sintetizado químicamente o recombinante del mismo, o un inhibidor de la expresión de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 La presente memoria descriptiva también divulga un compuesto farmacéutico que comprende al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN enlistados en las Tablas Ib, Id, IIb, IIc, Vb, Vd, VIb o VIc, miARN mimético sintetizado químicamente o recombinante del mismo, o un inhibidor de la expresión de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN enlistados en las Tablas Ib, Id, IIb, IIc, Vb, Vd, VIb o VIc y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, los miARN son los miARN enlistados en las Tablas Ie, IIf, IIg, Ve, Vf, VIe o VIc.
- 15 La presente memoria descriptiva divulga un método para tratar a un individuo en el que se ha diagnosticado la presencia de un tumor pulmonar o en el que se ha diagnosticado el riesgo de desarrollar un tumor pulmonar, respectivamente para el tratamiento del tumor pulmonar o para reducir y/o eliminar el riesgo de desarrollar un tumor pulmonar.
- 20 El método comprende los siguientes pasos para medir el nivel de expresión de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc, presente en una muestra de fluido biológico previamente recolectado de un individuo, y luego determinando los miARN que tienen valores medidos para el nivel de expresión que se desvían con respecto a un criterio de control predeterminado y respectivo. La evaluación de la desviación con respecto a un criterio de control puede usar los procedimientos de las proporciones de miARN descritas anteriormente para diversos casos.
- 25 Una vez que se han determinado los miARN sobreexpresados o subexpresados, el método comprende alterar el nivel de expresión de los miARN cuyos niveles de expresión se desvían con respecto al criterio del control respectivo.
- 30 Por ejemplo, para poder alterar el nivel de expresión de los miARN, el individuo puede ser administrado con un compuesto farmacéutico que tenga una cantidad efectiva de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN de los miARN enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc si el nivel de expresión medido del miARN o miARNs es inferior a un nivel de expresión del control respectivo.
- 35 Como alternativa, o además de lo mencionado anteriormente, también es posible administrar al individuo un compuesto farmacéutico que tiene una cantidad efectiva de al menos un compuesto para inhibir la expresión de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc si y para aquellos miARNs cuyo nivel de expresión medido está por encima del nivel de expresión del control.
- 40 De esta manera, los valores del nivel de expresión se pueden restablecer al nivel de expresión del control para los miARNs subexpresados con respecto al nivel de control de expresión respectivo y/o es posible reducir el nivel de expresión para los miARNs sobreexpresados.
- 45 Con el objetivo de restablecer el nivel de los miARNs subexpresados, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN de los miARNs de las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc, sintetizados químicamente (miméticos de miARN) o recombinantes.
- 50 Con el objetivo de reducir los valores del nivel de expresión al nivel de expresión del control para los miARNs sobreexpresados con respecto al nivel de expresión del control respectivo, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis inhibidores de miARN de un microARN de las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc. El inhibidor comprende, por ejemplo, uno o más de los siguientes: ARN de doble filamento, opcionalmente ARN interferencia corto (ARNcp), ácidos nucleicos antisentido (oligonucleótidos anti-miARN (OAM)), moléculas de ARN enzimático (ribozimas). El inhibidor es dirigido a un producto específico de microARN e interfiere con la expresión (por inhibición de la traducción o por inducción de la degradación) de un gen diana del microARN.
- 55 La administración de los compuestos anteriores (microARN sintéticos o miARN miméticos e inhibidores de microARN), por ejemplo, puede hacerse por medio de sistemas virales o nanopartículas que contienen microARN o inhibidor de microARN) unidos covalentemente con lípidos o liposomas encapsulados.

Los compuestos se pueden administrar por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, instilación intranasal, inhalación (aerosol), administración sistémica (inyección o infusión), inoculación directa en el tumor (donde está presente y visible), administración intrapleurica, administración endopleurica o una combinación de los mismos.

- 5 En términos de dosificación, la dosificación continua y prolongada se puede realizar a lo largo del tiempo. Como las moléculas de miARN están "naturalmente" presentes en el organismo, no se obtendrá una toxicidad relevante.

#### Aparatos biomarcadores y kits

- 10 La presente memoria descriptiva divulga un artículo que comprende un soporte que tiene una pluralidad de sitios, en el que cada sitio es capaz de recibir una cantidad de una muestra biológica, en el que cada uno de los sitios comprende al menos un reactivo capaz de unirse con al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc.

- 15 El reactivo se puede seleccionar del grupo que consiste en un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de al menos un miARN, al menos dos miARN, o al menos seis miARN, de los miARN enlistados en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc; un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de al menos un miARN, al menos dos miARN, o al menos seis miARN, del miARN enlistado en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc; y una sonda molecular configurada para reconocer una secuencia de al menos un miARN, al menos dos miARN, o al menos seis miARN, del miARN enlistado en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc .

- 20 La presente memoria descriptiva también divulga un artículo que comprende un soporte que tiene una pluralidad de sitios, en donde cada sitio es capaz de recibir una cantidad de una muestra biológica, en el que cada uno de los sitios comprende al menos un reactivo capaz de unirse con al menos uno miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, enlistados en las Tablas Ib, Id, IIb, IIc, Vb, Vd, VIb o VIc. Preferentemente, el miARN puede ser miARN que figura en la Tabla Ie, IIf, IIg, Ve, Vf, VIe o VIc.

- 25 La presente memoria descriptiva también divulga un aparato que comprende al menos una unidad capaz de recibir al menos uno de los artículos de la presente invención; medios para determinar el nivel de expresión de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN, enlistado en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc, y medios para calcular los cocientes reales entre los niveles de expresión de al menos un par, al menos dos pares, o al menos seis pares, de miARN de los pares de miARN enlistados en las Tablas IIIa, IIIc, IVa, IVc, VIIa, VIIc, VIIIa o VIIIc.

- 30 Los medios para determinar el valor del nivel de expresión se pueden seleccionar del grupo que consiste en PCR cuantitativa en tiempo real, tarjetas microfluidicas, microarreglos, PCR-RT, cuantitativa o semicuantitativa, northern blot, solución de hibridación y Secuenciación.

La presente memoria descriptiva divulga kits médicos útiles para aplicar de manera efectiva y sencilla los métodos descritos anteriormente, para determinar el riesgo de contraer un tumor o para el diagnóstico de tumores, por ejemplo, utilizando una muestra de sangre extraída de un individuo.

- 35 En su forma general, el kit comprende una plataforma que tiene una pluralidad de sitios, cada uno de los cuales está destinado a recibir una cantidad discreta respectiva de la muestra de fluido biológico (por ejemplo, sangre total, suero, plasma, saliva o condensado bronquial). En el sentido estructural, la plataforma puede ser un soporte para una tarjeta microfluidica con el miARN de interés con canales para la distribución a los sitios respectivos de un número predeterminado de muestras de fluido biológico. Cada sitio comprende a un reactivo capaz de unirse con al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN de los microARN de las Tablas Ia, Ic, IIa o IIc para determinar el riesgo de contraer un tumor o un reactivo capaz de unirse con al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN de los microARN de las Tablas Va, Vc, VIa o VIc para el diagnóstico de tumores, de tal manera que permita la detección con el aparato que se describe a continuación.

- 45 Por ejemplo, puede incluir al menos uno seleccionado de un grupo que comprende: un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN de los microARNs como en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc, un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN de los microARNs como en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc, una sonda molecular configurada para reconocer una secuencia de al menos un miARN, al menos dos miARN o al menos seis miARN de los microARNs como en las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc.

- 50 El kit médico descrito también se puede utilizar con un aparato médico que comprende una unidad que define un asiento para recibir uno o más kits y medios para determinar el valor de la expresión de los microARN de las Tablas Ia, Ic, IIa, IIc, Va, Vc, VIa o VIc. La determinación del valor del nivel de expresión se puede realizar por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, PCR cuantitativa en tiempo real, tarjetas microfluidicas, microarreglos, PCR-RT cuantitativa o semicuantitativa, Northern blot, solución de hibridación, secuenciación o combinaciones de las mismas.

- 55



5 El aparato también puede exhibir medios para calcular los valores de las proporciones reales entre valores de niveles de expresión de pares de microARN como en las Tablas IIIa, IIIc, IVa, IVc, VIIa, VIIc, VIIIa o VIIIc. Estos medios pueden comprender un programa y una unidad de procesamiento en la que el programa contiene instrucciones que, cuando son llevadas a cabo por el procesador, permiten calcular las proporciones. Alternativamente, se puede proporcionar un circuito analógico que sea capaz de realizar los cálculos.

miARN

En general, 24 miARN componen la firma de riesgo (R), firma de enfermedad agresiva (EA), firma de diagnóstico (D) y firma de presencia de enfermedad agresiva (EA). La Tabla IX recita esos 24 miARNs y con qué frecuencia aparecen como parte de una proporción para cada firma.

10

Tabla IX

miARN	R	EA	D	EA
hsa-miR-16	2	4	0	1
hsa-miR-17	4	4	3	3
hsa-miR-21	0	5	0	1
hsa-miR-101	4	4	2	1
hsa-miR-126	1	1	2	4
hsa-miR-145	0	2	3	1
hsa-miR-197	5	9	6	13
hsa-miR-221	0	2	0	0
hsa-miR-320	1	2	3	0
hsa-miR-451	7	10	0	11
hsa-miR-660	11	0	9	4
hsa-miR-106a	3	4	4	3
hsa-miR-133a	3	0	0	0
hsa-miR-140-3p	2	1	0	0
hsa-miR-140-5p	0	0	2	2
hsa-miR-142-3p	1	0	3	1
hsa-miR-148a	0	1	2	1
hsa-miR-15b	3	1	0	1
hsa-miR-19b	3	1	2	4
hsa-miR-28-3p	1	8	4	4
hsa-miR-30b	0	2	0	1
hsa-miR-30c	0	2	0	1
hsa-miR-486-5p	0	0	0	6
hsa-miR-92a	3	3	9	1

5 La presente memoria descriptiva divulga aparatos y kits para detectar al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos seis o los veinticuatro miARN de la Tabla IX. La presente invención proporciona aparatos y kits para activar o estimular la actividad o la expresión de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos seis o los veinticuatro miARN de la Tabla IX. La presente memoria descriptiva divulga aparatos y kits para disminuir o inhibir la actividad o la expresión de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos seis o los veinticuatro miARN de la Tabla IX. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas para activar o estimular la actividad o la expresión de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos seis o los veinticuatro de los miARN de la Tabla IX. La presente memoria descriptiva también divulga  
 10 composiciones farmacéuticas para disminuir o inhibir la actividad o la expresión de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos seis o los veinticuatro miARN de la Tabla IX.

La Tabla X proporciona un resumen del miARN descrito por la presente memoria descriptiva.

Tabla X

Nombre del miARN	Secuencia
hsa-miR-7-2 (pre-miR)	CUGGAUACAGAGUGGACCGGCUGGCCCAUCUGGAAGACUAGUGA UUUUGUUGUUGUCUACUGCGCUCAACAACAAUCCAGUCUACC UAAUGGUGCAGCCAUCGCA (SEQ ID NO:1)
hsa-miR-7-2-5p (brazo maduro miR 5')	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU (SEQ ID NO:2)
hsa-miR-7-2-3p (brazo maduro miR 3')	CAACAAUCCAGUCUACCUAA (SEQ ID NO:3)
hsa-miR-15b (pre-miR)	UUGAGGCCUUAAGUACUGUAGCAGCACAUCAUGGUUUACAUGCU ACAGUCAAGAUGCAGAAUCAUUUUUGCUGCUCUAGAAUUUAAGG AAAUUCAU (SEQ ID NO:4)
hsa-miR-15-5p (brazo maduro miR 5')	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA (SEQ ID NO:5)
hsa-miR-15-3p (brazo maduro miR 5')	CGAAUCAUUUUUGCUGCUCUA (SEQ ID NO:6)
hsa-miR-16-1 (pre-miR de Crom. 13)	GUCAGCAGUGCCUAGCAGCACGUAUUUUUGGCGUUAAGAUUCU AAAUUAUCUCCAGUAUUUAACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGAC (SEQ ID NO:7)
hsa-miR-16-2 (pre-miR de Crom. 3)	GUUCCACUCUAGCAGCACGUAUUUUUGGCGUAGUGAAAUUAUA UUAAACACCAAUAUUACUGUGCUGCUUUAGUGUGAC (SEQ ID NO:8)
hsa-miR-16-5p (brazo maduro miR 5')	UAGCAGCACGUAUUUUUGGCG (SEQ ID NO:9)
hsa-miR-16-3p (brazo maduro miR 3')	CCAAUAUUACUGUGCUGCUUUA (SEQ ID NO:10)
hsa-miR-17 (pre-miR)	GUCAGAAUAUGUCAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGUGAUUUGUG CAUCUACUGCAGUGAAGGCACUUGUAGCAUUUUGGUGAC (SEQ ID NO:11)
hsa-miR-17-5p (brazo maduro miR 5')	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG (SEQ ID NO:12)

ES 2 742 840 T3

hsa-miR-17-3p (brazo maduro miR 3')	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG (SEQ ID NO:13)
hsa-miR-19b-1 (pre-miR del Crom. 13)	CACUGUUCUAUGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGCUGUGUGA UAUUCUGCUGUGCAAUCCAUGCAAACUGACUGUGGUAGUG (SEQ ID NO:14)
hsa-miR-19b-1-5P (brazo maduro miR del Crom. 13)	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC (SEQ ID NO:15)
hsa-miR-19b-2 (brazo maduro miR 5' del Crom. X)	ACAUUGCUCUACUACAAUAGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCAGCGUA UAUAUGUAUAUGUGGCUGUGCAAUCCAUGCAAACUGAUUGUGA UAAUGU (SEQ ID NO:16)
hsa-miR-19b-2-5p (pre-miR del Crom. X)	AGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCA (SEQ ID NO:17)
hsa-miR-19b-3p (brazo maduro miR 3' del Crom. 13 ó X)	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA (SEQ ID NO:18)
hsa-miR-21 (pre-miR)	UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGG CAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGACA(SEQ ID NO:19)
hsa-miR-21-5p (brazo maduro miR 5')	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO:20)
hsa-miR-21-3p (brazo maduro miR 3')	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU (SEQ ID NO:21)
hsa-miR-28 (pre-miR)	GGUCCUUGCCCUCAAGGAGCUCACAGUCUAUUGAGUUACCUUUCU GACUUUCCACUAGAUUGUGAGCUCUCCUGGAGGGCAGGCACU (SEQ ID NO:22)
hsa-miR-28-5p (brazo maduro miR 5')	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG (SEQ ID NO:23)
hsa-miR-28-3p (brazo maduro miR 3')	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA (SEQ ID NO:24)
hsa-miR-30a (pre-miR)	GCGACUGUAAACAUCCUCGACUGGAAGCUGUGAAGCCACAGAUGG GCUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGCUGC (SEQ ID NO:25)
hsa-miR-30a-5p (brazo maduro miR 5')	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG (SEQ ID NO:26)
hsa-miR-30a-3p (brazo maduro miR 3')	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC (SEQ ID NO:27)
hsa-miR-30b (pre-miR)	ACCAAGUUUCAGUUCAUGUAAACAUCCUACACUCAGCUGUAAUAC AUGGAUUGGCUGGGAGGUGGAUGUUUACUUCAGCUGACUUGGA (SEQ ID NO:28)
hsa-miR-30b-3p (brazo maduro miR 5')	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU (SEQ ID NO:29)

ES 2 742 840 T3

hsa-miR-30b-3p (brazo maduro miR 3')	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC (SEQ ID NO:30)
hsa-miR-30c-1 (pre-miR del Crom. 1)	ACCAUGCUGUAGUGUGUGUAAACAUCCUACACUCUCAGCUGUGAG CUCAAGGUGGCUGGGAGAGGGUUGUUUACUCCUUCUGCCAUGGA (SEQ ID NO:31)
hsa-miR-30c-1-3p (brazo maduro miR 3' del Crom.1)	CUGGGAGAGGGUUGUUUACUCC (SEQ ID NO:32)
hsa-miR-30c-2 (pre-miR del Crom. 6)	AGAUACCUGUAAACAUCCUACACUCUCAGCUGUGGAAAGUAAGAAA GCUGGGAGAAGGCUGUUUACUCUUUCU (SEQ ID NO:33)
hsa-miR-30c-5p (brazo maduro miR 5' del Crom.1 ó 6)	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC (SEQ ID NO:34)
hsa-miR-30c-2-3p (brazo maduro miR 3' del Crom. 6)	CUGGGAGAAGGCUGUUUACUCU (SEQ ID NO:35)
hsa-miR-30d (pre-miR)	GUUGUUGUAAACAUCCCCGACUGGAAGCUGUAAGACACAGCUAAG CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGCUAC (SEQ ID NO:36)
hsa-miR-30d-5p (brazo maduro miR 5')	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG (SEQ ID NO:37)
hsa-miR-30d-3p (brazo maduro miR 3')	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGC (SEQ ID NO:38)
hsa-miR-34b (pre-miR)	GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUGUACUGUGGUG GUUACAAUCACUAACUCCACUGCCAUCAAAACAAGGCAC (SEQ ID NO:39)
hsa-miR-34b-5p (brazo maduro miR 5')	UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG (SEQ ID NO:40)
hsa-miR-34b-3p (brazo maduro miR 3')	CAAUCACUAACUCCACUGCCAU (SEQ ID NO:41)
hsa-miR-92a-1 (pre-miR del Crom. 13)	CUUUCUACACAGGUUGGGAUCCGGUUGCAAUGCUG UGUUUCUGUAA GGUAAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUUGAGUUUGG (SEQ ID NO:42)
hsa-miR-92a-1-5p (brazo maduro miR 5' del Crom. 13)	AGGUUGGGAUCCGGUUGCAAUGCU (SEQ ID NO:43)
hsa-miR-92a-3p (brazo maduro miR 3' del Crom. 13 o X)	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU (SEQ ID NO:44)
hsa-miR-92a-2 (pre-miR del Crom. X)	UCAUCCCUGGGUGGGGAUUUGUUGCAUUACUUGUGUUCUAUAUAA AGUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUGGAAGA (SEQ ID NO:45)
hsa-miR-92a-2-5p (brazo maduro miR 5' del Crom. 13 X)	GGGUGGGGAUUUGUUGCAUUAC (SEQ ID NO:46)
hsa-miR-101-1 (pre-miR del Crom. 1)	UGCCCUGGCUCAGUUAUCACAGUGCUGAUGCUGUCUAUUCUAAAG GUACAGUACUGUGAUAAACUGAAGGAUGGCA (SEQ ID NO:47)

ES 2 742 840 T3

hsa-miR-101-1-3P (brazo maduro miR 5' del Crom. 1 ó 9)	CAGUUAUCACAGUGCUGAUGCU (SEQ ID NO:48)
hsa-miR-101-1-3p (brazo maduro miR 3' del Crom. 1)	UACAGUACUGUGUAACUGAA (SEQ ID NO:49)
hsa-miR-101-2 (pre-miR del Crom. 9)	ACUGUCCUUUUUCGGUUUAUCAUGGUACCGAUGCUGUAUAUCUGAA AGGUACAGUACUGUGUAACUGAAGAAUGGUGGU (SEQ ID NO:50)
hsa-miR-101-2-3p (brazo maduro miR 3' del Crom. 9)	UACAGUACUGUGUAACUGAA (SEQ ID NO:51)
hsa-miR-106a (pre-miR)	CCUUGGCCAUGUAAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGCUUUUUGAGA UCUACUGCAAUGUAAGCACUUCUUACAUUACCAUGG (SEQ ID NO:52)
hsa-miR-106a-5p (brazo maduro miR 5')	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG (SEQ ID NO:53)
hsa-miR 106a-3p (brazo maduro miR 3')	CUGCAAUGUAAGCACUUCUJAC (SEQ ID NO:54)
hsa-miR-126 (pre-miR)	CGCUGGCGACGGGACAUUUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACU UCAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGCCGUCCACGGCA (SEQ ID NO:55)
hsa-miR-126-5p (brazo maduro miR 5')	CAUUUAUACUUUUGGUACGCG (SEQ ID NO:56)
hsa-miR-126-3p (brazo maduro miR 3')	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG (SEQ ID NO:57)
hsa-miR-133a-1 (pre-miR del Crom. 18)	ACAAUGCUUJGCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAAUCGCCUCUU CAAUGGAUUJGGUCCCUUCAACCAGCUGUAGCUAUGCAUUGA (SEQ ID NO:58)
hsa-miR 133a-2 (pre-miR del Crom. 20)	GGGAGCCAAAUGCUUJGCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAAUCG ACUGUCCAAUGGAUUJGGUCCCUUCAACCAGCUGUAGCUGUGCA UUGAUGGCGCCG (SEQ ID NO:59)
hsa-miR-133A (brazo maduro miR 3' del Crom. 18 o 20)	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG (SEQ ID NO:60)
hsa-miR-140 (pre-miR)	UGUGUCUCUCUCUGUGUCCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGG UUACGUCAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCACGGACAGGAUA CCGGGCACC(SEQ ID NO:61)
hsa-miR-140-5p (brazo maduro miR 5')	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG (SEQ ID NO:62)
hsa-miR-140-3p (brazo maduro miR 3')	UACCACAGGGUAGAACCACGG (SEQ ID NO:63)
hsa-miR-142 (pre-miR)	UGGGGCCUGGCUGGGUAUCAUCAUAUACUGUAAGUUUGCGAUG

ES 2 742 840 T3

	AGACACUACAGUAUAGAUGAUGUACUAGUCCGGGCACCCCC (SEQ ID NO:64)
hsa-miR-142-5p (brazo maduro miR 5')	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU (SEQ ID NO:65)
hsa-miR-142-3p (brazo maduro miR 3')	UGUAGUGUUUCCUACUUAUGGA (SEQ ID NO:66)
hsa-miR-144 (pre-miR)	UGGGGCCCUUGGCUGGGGAUAUCAUCAUAUACUGUAAGUUUGCGAUG AGACACUACAGUAUAGAUGAUGUACUAGUCCGGGCACCCCC (SEQ ID NO:67)
hsa-miR-144-5p (brazo maduro miR 5')	GGAUUCAUCAUAUACUGUAAG (SEQ ID NO:68)
hsa-miR-144-3p (brazo maduro miR 3')	UACAGUAUAGAUGAUGUACU (SEQ ID NO:69)
hsa-miR-145 (pre-miR)	CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUUCCAGGAAUCCCUUAGAUGC UAAGAUGGGGAUUCUGGAAUACUGUUCUUGAGGUCAUGGUU (SEQ ID NO:70)
hsa-miR-145-5p (brazo maduro miR 5')	GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU (SEQ ID NO:71)
hsa-miR-145-3p (brazo maduro miR 3')	GGAUUCCUGGAAUACUGUUCU (SEQ ID NO:72)
hsa-miR-148a (pre-miR)	GAGGCAAAGUUCUGAGACACUCCGACUCUGAGUAUGAUAGGAAGUC AGUGCACUACAGAACUUUGUCUC (SEQ ID NO:73)
hsa-miR-148a-5p (brazo maduro miR 5')	AAAGUUCUGAGACACUCCGACU (SEQ ID NO:74)
hsa-miR-148a-3p (brazo maduro miR 3')	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU (SEQ ID NO:75)
hsa-miR-197 (pre-miR)	GGCUGUGCCGGGUAGAGAGGGCAGUGGGAGGUAAGAGCUCUUCAC CCUUCACCACCUUCUCCACCCAGCAUGGCC (SEQ ID NO:76)
hsa-miR-197-5p (brazo maduro miR 5')	CGGGUAGAGAGGGCAGUGGGAGG (SEQ ID NO:77)
hsa-miR-197-3p (brazo maduro miR 3')	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC (SEQ ID NO:78)
hsa-miR-200b (pre-miR)	CCAGCUCGGGCAGCCGUGGCCAUUCUACUGGGCAGCAUUGGAUGG AGUCAGGUCUCUAAUACUGCCUGGUAUGAUGACGGCGGAGCCCU (SEQ ID NO:79)
hsa-miR-200b-5p (brazo maduro miR 5')	CAUCUACUGGGCAGCAUUGGA (SEQ ID NO:80)
hsa-miR-200b-3p (brazo maduro miR 3')	UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA (SEQ ID NO:81)

ES 2 742 840 T3

hsa-miR-205 (pre-miR)	AAAGAUCUCAGACAAUCCAUGUGCUUCUCUUGUCCUUCAUCCA CCGGAGUCUGUCUCAUACCCAACCAGAUUUCAGUGGAGUGAAGUU CAGGAGGCAUGGAGCUGACA (SEQ ID NO:82)
hsa-miR-205-5p (brazo maduro miR 5')	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG (SEQ ID NO:83)
hsa-miR-205-3p (brazo maduro miR 3')	GAUUUCAGUGGAGUGAAGUUC (SEQ ID NO:84)
hsa-miR-210 (pre-miR)	ACCCGGCAGUGCCUCCAGGCGCAGGGCAGCCCCUGCCCACCGCAC ACUGCGCUGCCCCAGACCACUGUGCGUGUGACAGCGGCUGAUCU GUGCCUGGGCAGCGCACCC (SEQ ID NO:85)
hsa-miR-210 (miR maduro)	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA (SEQ ID NO:86)
hsa-miR-219-1 (pre-miR)	CCGCCCGGGCCGCGGCUCUGAUUGUCCAAACGCAAUUCUGAG UCUAUGGCUCCGGCCGAGAGUUGAGUCUGGACGUCCCGAGCCGCC (SEQ ID NO:87)
hsa-miR-219-1-5p (brazo maduro miR 5')	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU (SEQ ID NO:88)
hsa-miR-219-1-3p (brazo maduro miR 3')	AGAGUUGAGUCUGGACGUCCCG (SEQ ID NO:89)
hsa-miR-221 (pre-miR)	UGAACAUCCAGGUCUGGGGCAUGAACCUUGGCAUACAAUGUAGAUU UCUGUGUUCGUUAGGCAACAGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUCAGG (SEQ ID NO:90)
hsa-miR-221-5p (brazo maduro miR 5')	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU (SEQ ID NO:91)
hsa-miR-221-3p (brazo maduro miR 3')	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC (SEQ ID NO:92)
hsa-miR-320a (pre-miR)	GCUUCGCUCCCCUCCGCCUUCUCUJCCCGGUUCUJCCCGGAGUCG GGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAGGAUGAGGU (SEQ ID NO:93)
hsa-miR-320a (miR maduro)	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA (SEQ ID NO:94)
hsa-miR-320b-1 (pre-miR del Crom. 1: 117214371-117214449)	AAUUAUCCUCUCUUUCUAGUUCUUCUAGAGUGAGGAAAAGCU GGGUUGAGAGGGCAAACAAUUAACUAAUUAUU (SEQ ID NO:95)
hsa-miR-320b-2 (pre-miR del Crom. 1: 224444706-224444843)	UGUUAUUUUUUGUCUUCUACCUAAGAAUUCUGUCUCUJAGGCUUU CUCUJCCAGAUJCCCAAAGUJGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGG CAAAGGAAAAAAAAGAAUUCUGUCUCUGACAUAUUJAGAUAGG (SEQ ID NO:96)

ES 2 742 840 T3

hsa-miR-320b (miR maduro del Crom. 1)	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA (SEQ ID NO:97)
hsa-miR-320c-1 (pre-miR del Crom. 18: 19263471-19263558)	UUUGCAUUAAAAUGAGGCCUUCUCUCCAGUUCUCCAGAGU CAGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGUAGAAAAAUGAUGUAGG (SEQ ID NO:98)
hsa-miR-320c-2 (pre-miR del Crom. 18-21901650-21901699)	CUUCUCUUCCAGUUCUCCAGAAUUGGGAAAAGCUGGGUUGAG AGGGU (SEQ ID NO:99)
hsa-miR-320-c (miR maduro de cualquier loci del Crom. 18)	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU (SEQ ID NO:100)
hsa-miR-320d-1 (pre-miR del Crom. 13)	UUCUCGUCCAGUUCUCCCAAAGUUGAGAAAAGCUGGGUUGAGA GGA (SEQ ID NO:101)
hsa-miR-320d-2 (pre-miR del Crom. X)	UUCUCUCCAGUUCUUCUUGGAGUCAGGAAAAGCUGGGUUGAGA GGA (SEQ ID NO:102)
hsa-miR-320d (miR maduro del Crom. 13 o X)	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA (SEQ ID NO:103)
hsa-miR-320e (pre-miR)	GCCUUCUCUCCAGUUCUCCUGGAGUCGGGGAAAAGCUGGGUU GAGAAGGU (SEQ ID NO:104)
hsa-miR-320e (miR maduro)	AAAGCUGGGUUGAGAAGG (SEQ ID NO:105)
hsa-miR-324 (pre-miR)	CUGACUAUGCCUCCCCGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGUAAAGCUG GAGACCCACUGCCCCAGGUGCUGCUGGGGGUUGUAGUC (SEQ ID NO:106)
hsa-miR-324 (brazo maduro miR 5')	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU (SEQ ID NO:107)
hsa-miR-324 (brazo maduro miR 3')	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG (SEQ ID NO:108)
hsa-miR-429 (pre-miR)	CGCCGGCCGAUGGGCGUCUACCAGACAUGGUUAGACCUGGCCU CUGUCUAAUACUGUCUGGUAAAACCGUCCAUCCGCUGC (SEQ ID NO:109)
hsa-miR-429 (miR maduro)	UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU (SEQ ID NO:110)
hsa-miR-451a (pre-miR)	CUUGGGAAUGGCAAGGAAACCGUUACCAUUACUGAGUUUAGUAAU GGUAAUGGUUCUCUUGCUAUACCCAGA (SEQ ID NO:111)
hsa-miR-451a (miR maduro)	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU (SEQ ID NO:112)



hsa-miR-451b (pre-miR)	UGGGUUAUAGCAAGAGAACCAUUACCAUUACUAAACUCAGUAAUGG UAACGGUUUCCUUGCCAUUCCCA (SEQ ID NO:113)
hsa-miR-451b (miR maduro)	UAGCAAGAGAACCAUUACCAUU (SEQ ID NO:114)
hsa-miR-486 (pre-miARN)	GCAUCCUGUACUGAGCUGCCCCGAGGCCCUUCAUGCUGCCCAGCU CGGGGCAGCUCAGUACAGGAUAC (SEQ ID NO:115)
hsa-miR-486-5p (brazo maduro miR 5')	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG (SEQ ID NO:116)
hsa-miR-486-3p (brazo maduro miR 3')	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU (SEQ ID NO:117)
hsa-miR-518e (pre-miR)	UCUCAGGCUGUGACCCUCUAGAGGGAAGCGUUUCUGUUGGCUAA AAGAAAAGAAAGCGCUUCCCUUCAGAGUGUGUUAACGCUUUGAGA (SEQ ID NO:118)
hsa-miR-518e 5p (brazo maduro miR 5')	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUG (SEQ ID NO:119)
hsa-miR-518e-3p (brazo maduro miR 3')	AAAGCGCUUCCCUUCAGAGUG (SEQ ID NO:120)
hsa-miR-660 (pre-miR)	CUGCUCUUCUCCCAUACCAUUGCAUAUCGGAGUUGUGAAUUCU CAAAAACAAAUCCUGUGUGCAUGGAUUACAGGAGGGUGAGCCUUGU CAUCGUG(SEQ ID NO:121)
hsa-miR-660-5p (brazo maduro miR 5')	UACCAUUGCAUAUCGGAGUUG (SEQ ID NO:122)
hsa-miR-660-3p (brazo maduro miR 3')	ACCUCUGUGUGCAUGGAUUA (SEQ ID NO:123)

Otras características y ventajas de la presente divulgación son evidentes a partir de los diferentes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Estudios, materiales y métodos

El presente estudio investigó el perfil de expresión de miARN en el plasma de individuos inscritos en protocolos de cribado utilizando tomografía computarizada en espiral. Esta investigación se realizó con el objetivo de verificar la capacidad de los miARN como una nueva clase de marcadores biomoleculares para: la predicción del riesgo de desarrollar un tumor, en particular un tumor pulmonar, y el diagnóstico del tumor, en particular el tumor pulmonar, y por lo tanto como una ayuda pronóstica para discriminar pacientes con lesiones pulmonares indolentes o agresivas.

Se utilizaron muestras de plasma tomadas de individuos fumadores, donde los individuos tenían más de 50 años, en un parámetro de tiempo de entre uno y dos años antes de la detección con tomografía computarizada en espiral de la presencia de un tumor pulmonar en los mismos individuos. También se utilizaron muestras de plasma recolectadas en el momento de la aparición de la enfermedad (detectadas mediante tomografía computarizada en espiral). Las muestras de plasma se obtuvieron de pacientes que habían desarrollado un tumor pulmonar con diversas características en términos de agresividad clínica (nódulos indolentes o tumores avanzados y metastásicos), así como de individuos que permanecieron libres de enfermedad durante toda la duración del cribado.

En una primera etapa de la investigación, se realizó la identificación de los microARN que estaban presentes en el plasma utilizando tarjetas microfluídicas, modelo: TaqMan® de Applied Biosystems. De 378 microARN analizados,

100 estaban presentes de manera estable en el plasma de individuos fumadores sanos utilizados como grupo control. Por lo tanto, con una gran cantidad de datos iniciales, existe un acuerdo general sobre la posibilidad de normalizar los niveles de expresión de los microARN individuales en la media de los niveles de expresión de los 100 microARN para cada individuo (Mestdagh P et al. Genome Biol, 2009). Los datos obtenidos utilizando este tipo de normalización se compararon con los obtenidos al normalizar con de microARN constitutivo potencial (por ejemplo, mir-16, mammU6, RNU44 o RNU48).

Los inventores pensaron entonces en no utilizar más los valores de los niveles de expresión de los microARNs individuales, sino las proporciones entre pares de los mismos. El valor del umbral del ciclo ( $U_c$ ) obtenido por PCR cuantitativa en tiempo real con el software SDS 2.2.2® (Applied Biosystems) se transformaron en el valor de expresión correspondiente ( $2^{-U_c}$ ). Luego, se calculó la proporción entre el valor del nivel de expresión de cada par de microARNs posibles, las proporciones totales de 4950 se obtuvieron por la fórmula  $100 * 99/2$  como la proporción entre dos miARN y el recíproco que contiene los mismos datos. Finalmente, se analizó la variación de estas proporciones (llamadas "proporciones de miARN") en el plasma de las diversas clases de pacientes para identificar biomarcadores en plasma.

Los resultados mostraron que los microARNs presentes en mayor cantidad en las proporciones que discriminan entre las clases de pacientes son los mismos que emergen de los análisis realizados al normalizar el valor medio de los niveles de expresión de los 100 microARNs para cada individuo, validando así el método basado en las proporciones de miARN para cuantificar a los microARNs involucrados.

En mayor detalle, con la intención de identificar biomarcadores en el plasma que puedan predecir la aparición del tumor pulmonar, los inventores estudiaron el perfil de expresión de los microARNs circulantes en muestras recolectadas hasta dos años antes del diagnóstico de la enfermedad y en el momento de la cirugía en pacientes de dos ensayos clínicos independientes, como se mencionó anteriormente, para el diagnóstico temprano del tumor pulmonar en individuos de alto riesgo (edad >50 años y fumadores) mediante tomografía computarizada en espiral. En el primer conjunto de entrenamiento, compuesto por 40 muestras de plasma de 19 pacientes y 27 muestras de plasma de individuos sanos de control en 5 grupos diferentes, los niveles de expresión de miARN se analizaron utilizando ensayos de microARN TaqMan (Applied Biosystems) con la intención de identificar a las proporciones de miARN significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre muestras de pre-enfermedad recolectadas en plasma, en el momento de la cirugía y de individuos sanos.

La especificidad y sensibilidad de las firmas de microARNs así obtenidos se compararon con el conjunto de validación compuesto, como se describió anteriormente, de 32 muestras de plasma de 22 pacientes y 54 muestras de plasma de individuos de control sanos, agrupados en 10 grupos diferentes.

Para la generalización de las firmas utilizadas para predecir la agresividad de la enfermedad, los inventores agruparon a las dos cohortes (conjunto de entrenamiento y conjunto de validación) con el objetivo de obtener un número suficiente para el análisis estadístico. Los casos con un pronóstico desfavorable se compararon primero con los controles respectivos y las firmas así obtenidas se probaron para evaluar su capacidad efectiva para discriminar a los pacientes con mal pronóstico de aquellos que tienen un buen pronóstico.

Como ya mencionó anteriormente, las firmas de los microARNs identificados en los diversos análisis se validaron en dos conjuntos independientes constituidos por individuos de alto riesgo (fumadores mayores de 50 años) inscritos en dos ensayos clínicos diferentes para la identificación temprana de tumor pulmonar utilizando tomografía computarizada en espiral de baja dosis: un primer conjunto, o conjunto de entrenamiento, compuesto por 40 muestras de plasma de 19 pacientes y 27 muestras de plasma de individuos de control sanos agrupados en 5 grupos diferentes y un segundo conjunto o conjunto de validación (es decir, en un segundo grupo de individuos) compuesto por 32 muestras de plasma de 22 pacientes y 54 muestras de plasma de individuos de control sanos, agrupados en 10 grupos diferentes.

La Figura 1 es un resumen de las características clínicas patológicas del conjunto de entrenamiento y el conjunto de validación seleccionado para el análisis de los niveles de expresión de los miARNs en las muestras de plasma.

Para determinar el perfil de microARN en las muestras de plasma, se extrajo el ARN total de 200  $\mu$ l de plasma utilizando el kit mirVana™ PARIS™ (Ambion), eluyendo en 50  $\mu$ l de tampón de elución.

Los niveles de expresión se determinaron utilizando PCR cuantitativa en tiempo real a partir de 3  $\mu$ l de elución primero utilizando el Meg-aplex™ Pools Protocol en una tarjeta microfluídica, tipo A (Applied Biosystems), luego el Multiplex™ Pools Protocol (Applied Biosystems).

Todos los datos se extrapolaron utilizando el software Sequence Detection System (SDS 2.2.2® Applied Biosystems), estableciendo el umbral manualmente en 0.2 y la línea de base entre 3 y 18 ciclos (en un total de 40).

Además del equipo estándar para biología molecular, se hizo uso de PCR cuantitativa en tiempo real 7900-HT (Applied Biosystems) y GeneAmp© 9700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Identificación de una firma basada en miARNs capaces de identificar a individuos en riesgo de desarrollar tumor pulmonar

5 Las muestras de plasma recolectadas 1-2 años antes de pacientes en quienes un tumor fue diagnosticado más tarde utilizando tomografía computarizada en espiral fueron analizados y comparados con el grupo control, constituido por individuos sanos.

10 Por lo tanto, se identificó una firma en el entrenamiento que comprende 14 proporciones de miARN formadas por 14 microARNs capaces de discriminar correctamente 18 de 20 muestras previas a la enfermedad de individuos que luego desarrollarán la enfermedad (90% de sensibilidad), mientras que solo un grupo control fue positivo para esta firma (80% de especificidad). En el conjunto de validación, la sensibilidad fue del 80%, mientras que la especificidad fue del 90% (AUC-RDM = 0.85,  $p < 0.001$ ).

Las proporciones de miARN del primer ejemplo se enumeran a continuación y se reportan también en la Figura 4A.

Q<sub>1</sub>= hsa-miR-106a / hsa-miR-451

Q<sub>2</sub>= hsa-miR-140-5p / hsa-miR-320

15 Q<sub>3</sub>= hsa-miR-140-5p / hsa-miR-451

Q<sub>4</sub>= hsa-miR-140-5p / hsa-miR-660

Q<sub>5</sub>= hsa-miR-140-5p / hsa-miR-92a

Q<sub>6</sub>= hsa-miR-15b / hsa-miR-92a

Q<sub>7</sub>= hsa-miR-17 / hsa-miR-451

20 Q<sub>8</sub>= hsa-miR-197 / hsa-miR-451

Q<sub>9</sub>= hsa-miR-19b / hsa-miR-660

Q<sub>10</sub>= hsa-miR-221 / hsa-miR-660

Q<sub>11</sub>= hsa-miR-28-3p / hsa-miR-660

Q<sub>12</sub>= hsa-miR-30b / hsa-miR-92a

25 Q<sub>13</sub>= hsa-miR-30c / hsa-miR-451

Q<sub>14</sub>= hsa-miR-30c / hsa-miR-660

30 La capacidad predictiva de esta firma se validó en muestras recolectadas hasta 28 meses antes del diagnóstico de la enfermedad con tomografía computarizada en espiral y los microARN desregulados con mayor frecuencia fueron: mir-660, mir-140-5p, mir-451, mir-28-3p, mir-30c y mir-92.

Identificación de la firma basada en los miARNs capaces de tener valor de diagnóstico

35 Las muestras de plasma recolectadas en el momento de la cirugía o en la identificación de la enfermedad por tomografía computarizada en espiral se compararon con los grupos control. En el conjunto de entrenamiento, un panel de 16 proporciones de miARN, compuesto por 13 microARNs, clasifica correctamente a 16 de los 19 pacientes con una sensibilidad del 84% y una especificidad del 80%. En el conjunto de validación, la sensibilidad es del 75% y la especificidad es del 100% (AUC-RDM = 0.88,  $p < 0.0001$ ).

40 Una menor sensibilidad en el conjunto de validación puede correlacionarse con la presencia de un mayor número de pequeños nódulos indolentes, de los cuales dos pacientes son parte, cuyas muestras de sangre no coincidían con la firma de riesgo en las muestras previas a la enfermedad, y por la firma en las muestras tomadas en presencia de la enfermedad.

Las proporciones de miARN del segundo ejemplo se enlistan a continuación y también se reportan en la Figura 4B.

Q<sub>1</sub>= hsa-miR-106a / hsa-miR-140-3p

Q<sub>2</sub>= hsa-miR-106a / hsa-miR-30c

Q<sub>3</sub>= hsa-miR-106a / hsa-miR-486-5p

## ES 2 742 840 T3

- Q<sub>4</sub>= hsa-miR-140-3p / hsa-miR-17  
Q<sub>5</sub>= hsa-miR-140-5p / hsa-miR-660  
Q<sub>6</sub>= hsa-miR-15b / hsa-miR-660  
Q<sub>7</sub>= hsa-miR-15b / hsa-miR-92a  
5 Q<sub>8</sub>= hsa-miR-17 / hsa-miR-30c  
Q<sub>9</sub>= hsa-miR-17 / hsa-miR-451  
Q<sub>10</sub>= hsa-miR-17 / hsa-miR-486-5p  
Q<sub>11</sub>= hsa-miR-19b / hsa-miR-451  
Q<sub>12</sub>= hsa-miR-19b / hsa-miR-660  
10 Q<sub>13</sub>= hsa-miR-19b / hsa-miR-92a  
Q<sub>14</sub>= hsa-miR-21 / hsa-miR-92a  
Q<sub>15</sub>= hsa-miR-28-3p / hsa-miR-660  
Q<sub>16</sub>= hsa-miR-28-3p / hsa-miR-92a
- 15 Esta firma de diagnóstico se utilizó para verificar la presencia de la enfermedad en las muestras de plasma recolectadas antes de la identificación de la enfermedad por tomografía computarizada en espiral. En el conjunto de entrenamiento, 11 de 20 (55%) de los casos se clasifican como en presencia de la enfermedad y, e interesantemente, de estos 11, 10 son casos de diagnóstico pesimista o pertenecen a pacientes en los que se identificó el tumor en los últimos posteriores al cribado, o donde se identificaron tumores más agresivos con peores pronósticos.
- 20 Se obtuvieron resultados muy similares en el conjunto de validación, ya que en 10 de 15 (66,6%) muestras pre-enfermedad presentaron la firma de la presencia de la enfermedad. Hay solo 4 proporciones de miARN en común entre las firmas de riesgo y las firmas de diagnóstico; También son parcialmente diferentes los microARNs involucrados: mir-17, mir-660, mir-92a, mir-106a, mir-19b son los microARNs más desregulados en el momento del diagnóstico del tumor pulmonar.
- 25 Identificación de una firma basada en los miARNs para el riesgo de desarrollo de tumor pulmonar agresivo
- Se identificaron los perfiles de microARN de las muestras pre-enfermedad con pronóstico desfavorable y se identificaron 10 proporciones de miARN capaces de reconocer a 5 de 5 pacientes en el primer conjunto, 4 de 5 en el conjunto de validación y con una especificidad en ambos del 100%. Se hace notar que mir-221, mir-660, mir-486-5p, mir-28-3p, mir-197, mir-106a, mir-451, mir-140-5p y mir-16 son los microARNs desregulados.
- 30 Las proporciones de miARN de este tercer ejemplo se enumeran a continuación y también se reportan en la Figura 4C.
- Q<sub>1</sub>= hsa-miR-106a / hsa-miR-660  
Q<sub>2</sub>= hsa-miR-140-5p / hsa-miR-486-5p  
Q<sub>3</sub>= hsa-miR-16 / hsa-miR-197  
35 Q<sub>4</sub>= hsa-miR-197 / hsa-miR-486-5p  
Q<sub>5</sub>= hsa-miR-197 / hsa-miR-660  
Q<sub>6</sub>= hsa-miR-221 / hsa-miR-451  
Q<sub>7</sub>= hsa-miR-221 / hsa-miR-660  
Q<sub>8</sub>= hsa-miR-28-3p / hsa-miR-451  
40 Q<sub>9</sub>= hsa-miR-28-3p / hsa-miR-486-5p  
Q<sub>10</sub>= hsa-miR-28-3p / hsa-miR-660

5 Esta firma se probó a continuación en las muestras pre-enfermedad de los pacientes que tenían un buen pronóstico en el conjunto de entrenamiento y en el conjunto de validación. La firma clasifica, respectivamente en los dos conjuntos, el 33.3% y el 45% de las muestras; La Figura 2 ilustra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con o sin la firma de riesgo de la enfermedad agresiva; la curva con la firma agresiva está representada en una línea continua e identificada por REA+ (riesgo de enfermedad agresiva +) mientras que la curva sin la firma del riesgo de la enfermedad agresiva está representada por una línea discontinua e identificada por REA- (riesgo de enfermedad agresiva -) en muestras de plasma recolectadas 1-2 años antes de la identificación de la enfermedad por tomografía computarizada en espiral.

10 Es de interesante el hecho de que la mayoría de las muestras identificadas pertenecen a individuos que desarrollaron el tumor entre el año III y V del cribado, independientemente del grado del tumor. Esto respalda la observación previa sobre las muestras tumorales y normales de tejido pulmonar, donde un perfil diferente de microARN estaba presente respectivamente en el tejido tumoral y en el tejido normal de los mismos pacientes. Es importante señalar que entre los pacientes que tenían un tumor diagnosticado en el segundo año del cribado (todos los tumores en los estadios Ia y Ib), solamente un caso con estadio Ib mostró la firma de riesgo agresivo.

15 Identificación de una firma basada en miARNs para el pronóstico de pacientes identificados por tomografía computarizada en espiral

20 Se analizaron las muestras de pacientes que tenían un pronóstico pesimista, recolectadas en el momento del diagnóstico de la enfermedad, revelando una firma de 10 proporciones de miARN, todas conteniendo mir-486-5p, que identifica a 7 de 8 pacientes con un pronóstico pesimista en el conjunto de entrenamiento, 2 de 3 del conjunto de validación y ningún grupo control en los conjuntos de datos.

Las proporciones de miARN de este cuarto ejemplo se enumeran a continuación y también se reportan en la Figura 4D.

$$Q_1 = \text{hsa-miR-106a} / \text{hsa-miR-486-5p}$$

$$Q_2 = \text{hsa-miR-126} / \text{hsa-miR-486-5p}$$

25  $Q_3 = \text{hsa-miR-142-3p} / \text{hsa-miR-486-5p}$

$$Q_4 = \text{hsa-miR-148a} / \text{hsa-miR-486-5p}$$

$$Q_5 = \text{hsa-miR-15b} / \text{hsa-miR-486-5p}$$

$$Q_6 = \text{hsa-miR-17} / \text{hsa-miR-486-5p}$$

$$Q_7 = \text{hsa-miR-197} / \text{hsa-miR-486-5p}$$

30  $Q_8 = \text{hsa-miR-21} / \text{hsa-miR-486-5p}$

$$Q_9 = \text{hsa-miR-221} / \text{hsa-miR-486-5p}$$

$$Q_{10} = \text{hsa-miR-28-3p} / \text{hsa-miR-486-5p}$$

35 Adicionalmente, solamente 2 de 11 y 2 de 13 pacientes que tienen un buen pronóstico, respectivamente en el primer y segundo conjunto, son positivos para esta firma. La Figura 3 reporta una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con o sin las firmas de presencia de la enfermedad agresiva (identificados respectivamente con la línea continua de PEA+, que representa la presencia de la enfermedad agresiva +, y con la línea discontinua de PEA-, representando la presencia de la enfermedad agresiva -) en muestras de plasma recolectadas en el momento de la identificación de la enfermedad por tomografía computarizada en espiral.

40 Adicionalmente, esta firma se utilizó para clasificar las muestras pre-enfermedad en ambos conjuntos de datos. La mitad de los pacientes con pronóstico pesimista también presentan esta firma de agresividad, mientras que para aquellos con buen pronóstico de los 6 positivos para esta firma, 5 son tumores identificados después del tercer año de detección.

45 Téngase en cuenta que mir-486-5p, en comparación con mir-21, mir-126, mir-15b, mir-148a, mir-142-3p, mir-17, mir-197, mir-221, mir-28-3p y mir-106a, siempre se subexpresan en el plasma de pacientes con un pronóstico pesimista.

A partir de los resultados reportados anteriormente, los inventores dedujeron que los microARNs presentes en el plasma son útiles para identificar la presencia del tumor pulmonar incluso 1-2 años antes de la detección por tomografía computarizada en espiral y para además predecir el desarrollo de tipos de cáncer pulmonar más agresivos, lo que indica la posibilidad de seleccionar individuos con alto riesgo en función de los perfiles de microARN circulante.

50 Ejemplo 2

## Tratamiento de miARN

El ejemplo instantáneo demuestra la modificación del nivel de dos microARNs de nuestras firmas de plasma en una línea celular de cáncer de pulmón (A549). Mir-486 y mir-660 se regularon negativamente en muestras de plasma de pacientes con cáncer de pulmón y, en particular, en aquellos que desarrollaron la forma agresiva de la enfermedad. En la Figura 9, los niveles de microARN se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real en 20 pares de tumores y de tejido pulmonar normal de los mismos pacientes inscritos en el ensayo de detección por tomografía computarizada utilizado como conjunto de validación. Los datos de la fila Uc se normalizaron en el miARN RNU6B (DUc) de limpieza. Los valores de expresión finales se obtuvieron con la fórmula:  $2^{-(DUc \text{ del tejido tumoral})} / 2^{-(DUc \text{ del pulmón normal})}$ . Valores  $> 1$   $\rightarrow$  regulados positivamente en el tejido tumoral. Valores  $< 1$   $\rightarrow$  regulados negativamente en tejido tumoral. Los resultados en la Figura 9 muestran que estos dos miARN estaban regulados negativamente en el tejido tumoral en comparación con el tejido pulmonar normal.

En la Figura 10 se utilizaron miRNA mímico mirVNA™ (Applied biosystem) para transfectar a la línea celular de cáncer de pulmón que expresa constitutivamente a la proteína verde fluorescente (A549-GFP), de acuerdo con el protocolo estándar Lipofectamine2000 (Invitrogen). 24 horas después de la transfección, las células se colocaron en una placa multipocillo para evaluar la capacidad de proliferación. Las mediciones en tiempo real de la señal de GFP se midieron cada 24 horas con un lector fluorescente de placa múltiple (Tecan M1000) utilizando las longitudes de onda de GFP. En la Figura 10, 549-GFP transfectada con el miARN mímico mir-486-5p y mir-660 mostró una capacidad proliferativa reducida en comparación con el tipo silvestre y con las líneas celulares con miARN mímico revuelto (ctrl-).

En la Figura 11, las células 549-GFP se transfectaron con miARN mímico como se reportó anteriormente. 24 horas después de la transfección, las células fueron sembradas en insertos de cultivos celulares Falcon™ FluoroBlok™ de 8.0  $\mu\text{m}$  (BD biosciences) colocados en una placa de 24 pocillos. La capacidad de migración celular se evaluó midiendo la señal de GFP utilizando la herramienta de lectura inferior del Tecan M1000, de esta manera fue posible leer solo la señal de las células que pasaron a través de la membrana del inserto. La migración en tiempo real fue seguida durante 4 días. En la Figura 11, 549-GFP transfectada con el miARN mímico mir-486-5p y mir-660 mostró una capacidad de migración reducida en comparación con el tipo silvestre y las líneas celulares con miARN mímico revuelto (ctrl-).

Por lo tanto, los resultados muestran que, si estos dos miARN se restauraron en la línea celular cancerígena, la capacidad de proliferación (Figura 10) y la migración (Figura 11) de las células cancerígenas se reducen significativamente. Estos resultados preliminares apoyan la idea de utilizar a estos miARN para un enfoque terapéutico putativo.

## Ejemplo 3

## Detección y supervivencia del cáncer de pulmón

La cohorte INT-IEO (conjunto de entrenamiento). Se diagnosticó cáncer de pulmón en 38 sujetos, 22 en los primeros 2 años y 16 del tercero al quinto año del cribado, incluyendo un cáncer de intervalo en el cuarto año. La frecuencia del estadio I fue del 63% (77% en los primeros 2 años vs. 44% en los últimos 3 años), y el adenocarcinoma fue del 71% (95% en los primeros 2 años vs. 63% en los últimos 3 años; Tabla XI)

Tabla XI.

Característica	TC Año		Total
	1-2	3-5	
Cáncer de pulmón	22	16	38
Resecado	21 (95)	12 (75)	33* (87)
Estadio I	17 (77)	7 (44)	24 (63)
Estadio II-IV	5 (23)	9 (56)	14 (37)
Adenocarcinoma	17 (95)	10 (63)	27 (71)
* 28 muestras de tejido tumoral y 24 muestras de pulmón normal estaban disponibles para el análisis de expresión de miARN. El número entre paréntesis es el porcentaje de todos los cánceres de pulmón detectados.			

El tiempo medio de seguimiento para los 38 casos de cáncer de pulmón fue de 75 meses, con un 60% de supervivencia global a 5 años (95% I.C.: 43-74%). La supervivencia global a los cinco años fue del 92% para el estadio I y del 7% para los estadios II-IV (P<0.001; Figura 12A). Cuando se consideró el año de detección, la supervivencia global a los 5 años fue del 77% para los cánceres diagnosticados en los primeros 2 años en comparación con el 36% para los

5 detectados del tercer al quinto año del cribado ( $P = 0.005$ ; Figura 12B), indicando que los cánceres incidentales representan una enfermedad más agresiva. El año de detección y el estadio del tumor se asociaron significativamente (prueba  $\chi^2$ ,  $P = 0.034$ ). En el subconjunto de TC año 1-2/estadio I, la supervivencia a 5 años fue del 94% (I.C. 95%: 65.0-99.1). En todo el grupo del estadio I, después de la exclusión de una muerte por segundo cáncer primario de pulmón y una por trastorno pulmonar obstructivo crónico (TPOC) en etapa terminal, la supervivencia a 5 años fue del 100%.

10 La cohorte multicéntrica de detección pulmonar italiana (MDPI) (conjunto de validación). Al final del cuarto año de detección en el ensayo MDPI, se diagnosticó cáncer de pulmón en 53 sujetos, 24 en los primeros 2 años y 23 en el tercer y cuarto año. Se diagnosticaron seis cánceres de intervalo: uno en el primer año, dos en el segundo año, y tres en el tercer año. La enfermedad en estadio temprano (Ia-Ib) se diagnosticó en 28 (53%) pacientes, y el adenocarcinoma se diagnosticó en 30 (57%) de los pacientes. Debido a que este ensayo está en curso, hasta el momento no se ha realizado ningún análisis intermedio. Sin embargo, incluso si el tiempo medio de seguimiento de 23 meses es relativamente corto, podríamos dividir a los 53 pacientes en dos grupos de tamaño razonable: 14 pacientes con mal pronóstico (muertos o vivos con enfermedad incurable) y 39 pacientes con buen pronóstico (vivos sin enfermedad).

15 Perfiles de expresión de miARN en tumor pulmonar y en pulmón normal

Se analizaron los perfiles de miARN pareados de 28 tumores y de 24 tejidos pulmonares normales utilizando una plataforma de microarreglos de miARN. La validación de los miARN expresados diferencialmente se realizó utilizando PCR cuantitativa en tiempo real.

20 Por comparación de clase y análisis de predicción de clase (utilizando algoritmos pareados y no pareados), la expresión de 56 miARNs fue significativamente diferente al nivel nominal de 0.001 de la prueba univariada. Los 10 miARN desregulados principales que discriminan el cáncer de pulmón detectado por tomografía computarizada del tejido pulmonar normal fueron: mir-7, mir-21, mir-200b, mir-210, mir-219-1, miR-324 (regulado positivamente), mir-126, mir-451, mir-30a y mir-486 (regulado negativamente; Tabla XII).

25 Tabla XII

miARNs desregulado ( $p < 0.001$ )	Tumor vs. Tejidos normales	
	Dirección	Cambio en el incremento
mir-7-2-prec	Positivamente	1.3
mir-126	Negativamente	0.4
mir-200b	Positivamente	1.3
mir-210	Positivamente	3.0
mir-219-1	Positivamente	1.6
mir-21	Positivamente	2.9
mir-324-5p	Positivamente	1.3
mir-451	Negativamente	0.5
mir-486-5p	Negativamente	0.5
mir-30a	Negativamente	0.6

30 Esta lista incluía alteraciones previamente identificadas en pacientes con cáncer de pulmón sintomático (por ejemplo, mir-21 y la familia mir-200, que se sabe que participan en vías como la supervivencia, la apoptosis, la transición epitelial-mesenquimatosa) y algunos cambios no identificados (por ejemplo, regulación negativa de miR-486 y miR-451).

Para validar los resultados obtenidos con la hibridación de microarreglos, los niveles de los dos miARN más regulados (mir-21 y mir-486) se evaluaron en muestras tumorales y normales mediante PCR cuantitativa en tiempo real, lo que confirmó la observación previa.

La expresión de miARN en tejidos está asociada con características clínico-patológicas

Entonces, se investigó la posible asociación de los perfiles de expresión de miARN con las características clínico-patológicas de los pacientes (Tabla XIII). Dos miARN (mir-205 y mir-21) discriminaron significativamente el adenocarcinoma de los histotipos de carcinoma de células cuadradas ( $P \leq 0.001$ ). Mir-518e y mir-144 fueron regulados negativamente en tumores con una tasa de crecimiento más rápida, y los niveles más altos de mir-429, miembro de la familia mir-200, se correlacionaron con una peor supervivencia libre de enfermedad (SLE).

Tabla XIII

Características clínicas-patológicas	Tejido tumoral			Tejido normal		
	miARN	Dirección	Valor P	miARN	Dirección	Valor P
Hisotipo (ADC vs. SCC ú otros)	mir-205	Negativamente	<0.001			
	mir-21-pre	Positivamente	<0.001			
Diámetro de la tasa de crecimiento ( $\geq 50\%$ vs. $> 50\%$ )	mir-518e	Positivamente	<0.001	mir-30d*	Positivamente	<0.001
	mir-144-pre	Positivamente	<0.001			
Supervivencia libre de la enfermedad (vivo vs. muerto o recaída)	mir-429	Negativamente	0.003	mir-34b	Positivamente	0.001

El perfil de expresión de miARN de los tumores detectados en los primeros 2 años del cribado fue significativamente diferente del perfil de tumores que aparecieron después del segundo año, con una expresión diferencial de ocho miARNs (mir-128, mir-129, mir-369-3p, mir-193, mir-339-3p, mir-185, mir-346 y mir-340). Estos resultados indican que estos grupos de tumores muestran diferentes perfiles de miARN asociados con características agresivas distintas, donde los tumores incidentes crecen más rápido.

El análisis de expresión de miARN en tejidos pulmonares normales también discriminó a los sujetos identificados en los primeros 2 años de los de años posteriores de cribado (mir-126\*, mir-126, let-7c, mir-222, mir-30e, mir-1-2, mir-29b-1, mir-30d-prec, mir-15a, mir-16; Figura 13). Se encontraron asociaciones significativas entre la expresión de miARNs en el pulmón normal y la reducción del volumen espiratorio forzado (VEF; mir-379 y mir-29-1\*), un crecimiento tumoral más rápido (mir-30d\*), SLE de los pacientes (mir-34b; Tabla XIII). Los resultados obtenidos por hibridación de microarreglos fueron validados independientemente por PCR cuantitativa en tiempo real.

Aunque no hubo diferencias significativas en los hábitos de fumar (paquetes por año, tiempo desde el momento para dejar de fumar), los pacientes detectados en los años 3-5 mostraron una mayor proporción de TPOC grave (criterios GOLD  $\geq 2$ , 33% frente a 5%; prueba  $\chi^2$ ,  $P = 0.02$ ).

Estos hallazgos indican que las firmas específicas de miARN en el microambiente pulmonar normal están asociadas con la agresividad tumoral y la historia clínica de los pacientes.

#### Análisis de enriquecimiento de vías

[Para el tumor discriminante de la firma de miARN de muestras normales, se realizó un análisis de enriquecimiento de la vía utilizando el software DIANA-mirPath en los objetivos genéticos predichos por microT-4.0, Pic-Tar y TargetScan-5. Este análisis mostró que muchos de los objetivos de miARN predichos están involucrados en la vía crítica afectada en el cáncer, como la supervivencia, la apoptosis, la transición epitelial-mesenquimal y la proliferación (XIV).

Tabla XIV.

Vía KEGG ( $P < 0.001$ )	No. de genes
Vía de señalización MAPK	159
Regulación del citoesqueleto de actina	133
Adhesión focal	130



Vía de señalización wnt	102
Guía de axones	93
Vía de señalización de la insulina	92
Vía de señalización de TGF-Beta	69
Vía de señalización ErbB	64
Uniones adherentes	62
Ribosoma	3

Perfiles de expresión de miARN en muestras de plasma: diseño del estudio

Los biomarcadores circulantes validados en plasma/suero podrían representar el estándar de oro para una aplicación clínica de rutina no invasiva. Razonamos que los biomarcadores de miARN ideales deberían identificarse antes del inicio de los tumores y ser capaces de predecir el desarrollo de la enfermedad agresiva frente a la indolente.

Para determinar si las firmas específicas de miARN ya son detectables en muestras de plasma recolectadas antes de la detección de la enfermedad, realizamos perfiles de expresión de miARN de alto rendimiento en muestras de plasma utilizando tarjetas microfluídicas TaqMan (Applied Biosystems). Primero analizamos muestras de plasma recolectadas >1 año antes del desarrollo de la enfermedad y en el momento de la detección de la enfermedad (TC/cirugía positiva) en el conjunto de entrenamiento (ensayo de cribado por TC INT-IEO). Generamos firmas de miARN que luego se validaron en muestras de plasma (también pre-enfermedad y en la detección de la enfermedad) de un conjunto de validación (cohorte de detección de TC MDPI). Las características clínico-patológicas de los conjuntos de entrenamiento y de validación se muestran en la Figura 1. Como grupos control, probamos 15 grupos de muestras de plasma (5-7 individuos por grupo, 81 individuos en total) recolectadas de sujetos libres de enfermedad (CT-en espiral negativa) de ambos ensayos, con una distribución de edad, sexo y hábitos de fumar similar a la de los casos.

Utilizando tarjetas microfluídicas, se encontró que 113 miARNs siempre se expresaban en todas las muestras de plasma, y se encontró que un subconjunto de 100 miARNs se expresaba consistentemente en los 15 grupos de control, con una buena reproducibilidad entre duplicados biológicos (Figura 15). Estos 100 miARNs se utilizaron para identificar biomarcadores circulantes de riesgo, diagnóstico y pronóstico en muestras de plasma recolectadas antes o en presencia de la enfermedad detectada por tomografía computarizada.

Proporciones de miARN como herramientas bioinformáticas para el análisis de miARN

Debido a que la normalización de los datos de miARN en muestras de plasma sigue siendo un tema controvertido, se calcularon las proporciones entre los valores de expresión de todos los miARNs expresados consistentemente en plasma. Cada valor de un solo miARN se comparó con los valores de todos los otros 99 miARNs, y se obtuvieron 4,950 proporciones y posteriormente se utilizaron para analizar las diferencias entre las clases de muestras, lo que resultó en la definición de las proporciones con relevancia clínica. Cuando se utilizan tarjetas microfluídicas, existe un acuerdo general sobre la normalización de la expresión de miARN único utilizando los valores medios de expresión de todos los miARN de cada tarjeta (13). Para validar la robustez del método de las proporciones de miARN, comparamos los resultados obtenidos independientemente por los dos métodos en las tarjetas de microfluidos. Los resultados mostraron que los miARNs en su mayoría desregulados en múltiples proporciones fueron los mismos que los detectados utilizando la normalización en el valor de expresión medio, lo que confirma la solidez del método de las proporciones.

El uso de las proporciones de miARN parece ser un método fácilmente aplicable con potencial para el uso clínico general que evita la necesidad de análisis a gran escala y de alto rendimiento y, por lo tanto, se utilizó para desarrollar firmas clínicamente útiles basadas en biomarcadores circulantes.

Identificación de perfiles de miARN circulantes de diagnóstico y pronóstico en muestras de plasma recolectadas antes y en el momento de la detección de la enfermedad

El análisis de comparación de clases se realizó inicialmente en el conjunto de entrenamiento para identificar un grupo de proporciones de miARN que mostraban diferencias estadísticamente significativas entre plasma prediagnóstico, diagnóstico y libre de enfermedad (P <0.05). Estas proporciones fueron validadas técnicamente, en un subconjunto de muestras, mediante ensayos de microARN TaqMan.

Para evaluar la consistencia de las proporciones de miARN dentro de los grupos de control, comparamos el valor de cada proporción en dos grupos control con el valor medio resultante del análisis de las muestras individuales que componen los grupos. Encontramos que los valores eran consistentes.

Sin embargo, debido a que algunas proporciones mostraron una alta variabilidad individual en los sujetos de control, posiblemente conduciendo a un alto número de falsos positivos, consideramos para los análisis adicionales solamente a aquellas proporciones con una mínima variabilidad entre grupos.

5 Las firmas obtenidas se utilizaron posteriormente para calcular la especificidad y la sensibilidad en un conjunto de validación independiente.

Debido a que el intervalo de niveles de expresión de miARN en los dos conjuntos de datos fue consistentemente diferente, posiblemente debido a un efecto de almacenamiento (14), los pacientes en cada conjunto de datos se compararon con los respectivos grupos control.

10 Para la generación de las firmas que predicen el resultado clínico (tanto antes como en presencia de enfermedad detectada por TC), debido al pequeño número de eventos, agrupamos a los dos conjuntos de datos. Los casos con malos resultados se compararon con los grupos control respectivos, y las firmas obtenidas se analizaron para determinar su poder de discriminar a pacientes con pronóstico malo (muerto y vivo con enfermedad) o bueno (sin enfermedad) en toda la cohorte.

La firma de miARN identifica a los individuos en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón

15 Para investigar si hay marcadores moleculares que predicen el desarrollo del cáncer de pulmón, se analizaron muestras recolectadas de pacientes 1 y/o 2 años antes de la detección de la enfermedad por TC y se compararon con los grupos de control de individuos que fumaban en exceso (Figura 14A - 14C).

20 Una firma de 16 proporciones compuestas por 15 miARNs podría discriminar correctamente 18 de 20 muestras de sujetos que desarrollaron cáncer de pulmón en el conjunto de entrenamiento (90% de sensibilidad) y resultó positivo en solamente 1 de los 5 grupos de control (80% de especificidad). En el conjunto de validación, esta firma identificó 12 de 15 muestras recolectadas antes de la detección del cáncer de pulmón por tomografía computarizada en espiral, con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 90% (AUC-RDM = 0.85,  $P < 0.0001$ ; Figura 4A). El valor predictivo de esta firma se evaluó como útil hasta 28 meses antes de la enfermedad, y mir-660, mir-140-5p, mir-451, mir-28-3p, mir-30c y mir-92a son los miARNs desregulados con mayor frecuencia.

25 Firma de miARN con valor de diagnóstico

30 Las muestras de plasma recolectadas en cirugía o en el momento de la detección de la enfermedad por tomografía computarizada en espiral se compararon con grupos de individuos libres de enfermedad para identificar un perfil de miARN asociado con el diagnóstico de cáncer de pulmón. En el conjunto de entrenamiento, un panel de 16 proporciones con 13 miARN diferentes clasificó a 16 de 19 pacientes, con una sensibilidad del 84% y una especificidad del 80%. En el conjunto de validación de muestras de plasma, 12 de 16 pacientes fueron discriminados correctamente, con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 100% (AUC-RDM = 0.88,  $P < 0.0001$ ; Figura 4B).

La menor sensibilidad observada puede estar relacionada con la presencia de un mayor número de pequeños nódulos en etapa temprana con comportamiento indolente en esta serie y la inclusión de dos pacientes mal clasificados tanto por la firma del diagnóstico como por el riesgo.

35 La firma de diagnóstico se utilizó posteriormente para la predicción de clase de muestras de plasma de pre-enfermedad en la misma serie. En el conjunto de entrenamiento, 11 de 20 (55%) casos se clasificaron como individuos con enfermedad y, e interesantemente, 10 de estos 11 casos se caracterizaron por un mal pronóstico (vivo o muerto con la enfermedad) o que pertenecían al grupo de pacientes identificados del tercer al quinto año de cribado. En el conjunto de validación, se obtuvieron resultados similares, con la presencia de la firma de la enfermedad ya en 10 de 15 (66.6%)  
40 muestras de plasma pre-enfermedad. Además, observando a las tres muestras de casos de cáncer a intervalos previos a la enfermedad (pacientes que desarrollaron cáncer de pulmón pocos meses después de un resultado negativo de la TC), solamente 1 paciente fue clasificado por la firma de riesgo. En cambio, 2 casos (incluido el 1 identificado por la firma de riesgo) ya mostraban la firma de diagnóstico 8-9 meses antes de la detección de la enfermedad. El caso de cáncer a intervalos no reconocido por ninguna firma tenía un tumor en estadio 1a con buen resultado, lo que sugiere  
45 la presencia de un nódulo de bajo riesgo.

Solo 4 proporciones fueron compartidas por las firmas de riesgo y de diagnóstico, y los miARNs involucrados fueron parcialmente diferentes. mir-17, mir-660, mir-92a, mir-106a y mir-19b fueron los más frecuentemente desregulados en el momento del diagnóstico de cáncer de pulmón.

50 En general, estos hallazgos refuerzan la observación de que el miARN circulante en plasma es detectable mucho antes de la detección clínica de la enfermedad por TC en espiral, lo que indica la posibilidad de seleccionar grupos de alto riesgo en función del perfil de miARN.

Firma de riesgo de miARN de desarrollar cáncer de pulmón agresivo

Analizamos los perfiles de expresión de miARN en muestras de plasma pre-enfermedad de individuos con resultados clínicos pobres para definir una firma de miARNs que identifique a individuos con alto riesgo de desarrollar una enfermedad agresiva.

5 Una firma de 10 proporciones, compuesta por 9 miARN diferentes, identificó a 5 de 5 pacientes con mal pronóstico (muertos o con enfermedad progresiva) en este primer conjunto (100% de sensibilidad y 100% de especificidad). En el conjunto de validación, 4 de 5 pacientes con mal pronóstico se clasificaron correctamente, incluyendo a un paciente con mal pronóstico que desarrolló un cáncer de intervalo. La sensibilidad de esta firma en el conjunto de validación fue del 80% con una especificidad del 100%.

10 mir-221, mir-660, mir-486-5p, mir-28-3p, mir-197, mir-106a, mir-451, mir-140-5p y mir-16 son los miARNs desregulados en la firma de la enfermedad agresiva.

15 La firma se utilizó entonces para la predicción de clase de muestras de plasma de pre-enfermedad de pacientes con buen pronóstico en conjuntos de entrenamiento y validación. La firma identificó a 5 de 15 (33.3%) pacientes en el conjunto de entrenamiento y 5 de 11 (45%) pacientes en el conjunto de validación (Figura 4C). Interesantemente, en ambos conjuntos de datos, la mayoría de estas muestras clasificadas pertenecían a pacientes cuyo tumor se detectó después del tercer año de cribado. Este hallazgo respalda nuestra observación previa en muestras de tejido en las que se identificó un perfil de miARN distinto en tejidos tumorales y tejidos normales de los mismos pacientes. Notablemente, entre los pacientes con tumor diagnosticado en el segundo año de cribado (todos los tumores en estadio Ia e Ib), solamente un caso con tumor en etapa 1b tenía la firma de riesgo de la enfermedad agresiva.

20 Estos resultados sugieren que los perfiles de miARN en muestras de plasma pre-enfermedad pueden predecir el desarrollo de tumores con peor pronóstico e incluso podrían ser útiles para identificar a aquellos tumores en estadio temprano con alto riesgo de evolución agresiva.

Expresión de miARN en muestras de plasma en el momento de la detección y el pronóstico de la enfermedad

25 Posteriormente observamos la asociación entre la expresión de miARN y el pronóstico en muestras de plasma recolectadas en el momento del diagnóstico de cáncer de pulmón generando una firma compuesta por 10 proporciones, todas contenían mir-486-5p. Esta firma identificó a 7 de 8 pacientes con mal pronóstico en el conjunto de entrenamiento (88% de sensibilidad y 100% de especificidad). La firma de la enfermedad agresiva se observó también en 2 de 10 muestras con buen pronóstico, una de ellas con un tumor en estadio Ib. En el conjunto de validación, solamente 3 muestras de plasma recolectadas en presencia de la enfermedad de pacientes con mal pronóstico estaban disponibles, y 2 de ellas tenían el perfil de enfermedad agresiva. El tercer caso fue mal clasificado por todos los análisis realizados en todas las muestras de plasma recolectadas durante las evaluaciones de cribado (Figura 4D).

35 Nuevamente, esta firma se utilizó para la predicción de clase de muestras de plasma pre-enfermedad de pacientes en los conjuntos de entrenamiento y de validación. La mitad de las muestras pre-enfermedad de pacientes con mal pronóstico fueron positivas para ambas firmas de enfermedad agresiva, mientras que las muestras pre-enfermedad de pacientes con buen pronóstico que mostraban la firma de la enfermedad agresiva pertenecían principalmente (5 de 6) a pacientes con tumores detectados después del tercer año de cribado. Es notable que, aunque las personas en el conjunto de entrenamiento tienen un seguimiento extendido y los datos de supervivencia general a 5 años están disponibles, el tiempo de observación de seguimiento medio más corto (14 meses) para los pacientes en el conjunto de validación podría afectar la fuerza de las firmas pronosticas.

40 mir-486-5p, comparado con mir-21, mir-126, mir-15b, mir-148a, mir-142-3p, mir-17, mir-197, mir-221, mir-28-3p, y mir-106a, parece estar siempre regulado negativamente en plasma de pacientes con malos resultados.

Análisis

45 La investigación de las características biológicas y moleculares del cáncer de pulmón indolente y agresivo es crítica para identificar marcadores de riesgo específicos para el desarrollo del cáncer de pulmón, para lograr la predicción y la intervención lo antes posible y, potencialmente, para definir nuevos objetivos terapéuticos.

50 En este estudio, nos hemos centrado en el papel de los miARNs como biomarcadores de la enfermedad pulmonar aprovechando la disponibilidad de muestras de tejido (tumoral y de pulmón normal) y múltiples muestras de plasma, recolectadas antes y en el momento de la detección de la enfermedad, de pacientes inscritos en dos ensayos diferentes de cribado de tomografía computarizada en espiral con seguimiento extendido. Estos pacientes desarrollaron tumores que muestran un comportamiento agresivo variable durante el transcurso de los ensayos.

55 Aunque estudios previos reportaron que los perfiles de expresión de miARN predicen la recurrencia y el pronóstico solamente en muestras de tumores de pulmón recolectadas en el momento de la cirugía para cáncer de pulmón sintomático, nuestro estudio proporciona resultados únicos en firmas de miARN capaces de identificar la presencia de cáncer de pulmón agresivo no solamente en el tumor, pero también en tejidos pulmonares normales y en muestras de plasma de pacientes. Además, los miARN desregulados en muestras de plasma recolectadas antes de la aparición clínica de la enfermedad fueron potentes predictores moleculares del desarrollo de enfermedades de alto riesgo.

En las muestras tumorales, confirmamos la regulación positiva de miARN conocidos como mir-21, un miARN con función proliferativa y anti-apoptótica que según se ha reportado, ataca a la diana PTEN, y se describe la regulación negativa de dos miARN (mir-486 y mir-451) que participan en el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación de las células madre bronquioalveolares. Los análisis de asociación revelaron que la expresión de mir-205 y mir-21 son marcadores vinculados a la histología de carcinoma de células escamosas (CCE) y adenocarcinoma (ADC), respectivamente, lo que confirma a estudios previos sobre la validez de estudiar la expresión de miARN en apoyo del diagnóstico histopatológico para una clasificación precisa de la histología tumoral. Interesantemente, los miARNs que se desregularon en los tumores más agresivos identificados en los años posteriores del cribado están involucrados en las rutas de adhesión e invasión: se reportó que miR-339 regula negativamente a la molécula de adhesión celular intercelular (MAIC)-1, y mir-128a ha estado involucrado en la promoción de la vía TGF $\beta$  de la invasión de células tumorales y metástasis. Este miARN se dirige específicamente a FOXO1A, un factor de transcripción involucrado en la señalización de AKT y la inhibición de la apoptosis.

El hallazgo de perfiles de expresión de miARN asociados con una enfermedad agresiva y una supervivencia pobre en los tejidos pulmonares normales de pacientes refuerza la evidencia existente sobre la influencia crítica del microambiente pulmonar normal en el desarrollo del tumor y, en el presente estudio, sobre la agresividad del tumor. Es posible especular que estos marcadores podrían representar signos moleculares de un "suelo" que, después de un daño extenso ocasionado por fumar, se vuelve permisivo, o incluso promueve, el desarrollo del cáncer. Varios miARNs desregulados en el tejido pulmonar normal de pacientes sometidos a cirugía están involucrados en las principales vías relacionadas con el cáncer. En particular, se sabe que miR-126 promueve la angiogénesis al reprimir a los inhibidores de la señalización de VEGF *spred1* y *pik3r2*, y *let-7* participa en programas pro-inflamatorios. Además, la señalización de AKT es la vía principal influenciada por miR-222, miR-30 regula el factor de crecimiento del tejido conectivo y mir-29b modula las moléculas de matriz antiapoptótica y prometastática reprimiendo a *Mcl-1*. También es interesante observar la regulación negativa de mir-34b en pacientes con peor SSE, dado que mir-34b es una diana bien conocida de p53, que coopera para controlar la proliferación celular y el crecimiento independiente a la adhesión. La observación de un posible papel pronóstico de varios miARNs en el pulmón normal abre la posibilidad de estrategias terapéuticas innovadoras dirigidas al huésped en lugar del tumor en sí.

Debido a que los miARNs circulantes en plasma podrían ser más específicos al tejido que específicos al tumor, decidimos realizar una expresión de miARN de alto rendimiento en perfiles de plasma utilizando tarjetas microfluídicas. Posteriormente, desarrollamos ensayos de PCR multiplex en tiempo real para validar, como ensayos de PCR únicos, las firmas de miARN asociadas significativamente con las características clínicas de los pacientes. Hemos optimizado los ensayos de miARN simples y altamente reproducibles y formulado un algoritmo adecuado para la validación de datos de PCR cuantitativa en tiempo real en plasma utilizando proporciones recíprocas de miARN. Nuestros hallazgos sugieren que la evaluación de una serie de miARNs en plasma mediante ensayos PCR cuantitativa en tiempo real es un procedimiento potencialmente útil y clínicamente aplicable para mejorar el manejo del cáncer de pulmón.

Los miARN desregulados en muestras de tejido rara vez se detectaron en muestras de plasma, lo que fortalece aún más la alta especificidad de tejido de los miARN y sugiere un papel predictivo de los miARNs en plasma independientemente de las muestras de tejido. Observamos que un conjunto parcialmente diferente de miARNs se desreguló en plasma antes y en el momento de la enfermedad. Este hallazgo podría explicarse por la consideración de que los genes y las vías necesarias en las fases tempranas del desarrollo de la enfermedad son diferentes de los necesarios para el mantenimiento y la progresión del tumor.

En general, los 21 miARNs que componen las firmas de riesgo, diagnóstico y pronóstico en plasma pertenecen a vías principales: envejecimiento celular (mir-19b, mir-17, mir-106), renovación de las células madre bronquioalveolares y hematopoyéticas (mir-486, mir-106a, 142-3p), recurrencia tumoral en el CPCNP en estadio I (mir-27b; mir-106a; mir-19b; mir-15b mir-16, mi-21) y agresividad del cáncer de pulmón (mir-221, mir-222). En particular, mir-17, mir-92a, mir-19b y mir-106a son onco-mirs que pertenecen a la misma familia responsable del aumento de la proliferación, la represión de la apoptosis y la inducción de angiogénesis. mir-197 regula la expresión del gen supresor de tumores *FUS1*, cuya expresión se pierde en una gran proporción de tumores pulmonares. mir-28-3p se encuentra en una región cromosómica que con frecuencia se amplifica en el cáncer de pulmón (3q28). mir-221 bloquea la expresión de PTEN que conduce a la activación de la vía AKT, y se sugiere que desempeña un papel importante en el crecimiento celular y la invasividad al orientarse hacia la vía PTEN/AKT. Las alteraciones de estas vías representan factores de riesgo bien establecidos y significativos en el cáncer de pulmón. Finalmente, en una publicación reciente sobre miARNs circulantes, mir-21, mir-126 y mir-486-5p también se identificaron como biomarcadores potenciales con valor diagnóstico en pacientes con CPCNP.

La identificación de firmas de miARN en muestras de plasma recolectadas 1-2 años antes de la enfermedad que predicen el desarrollo y el pronóstico del cáncer es potencialmente útil en la selección de individuos de alto riesgo que necesitan someterse a la vigilancia de tomografía computarizada en espiral. Es de destacar que las firmas específicas de miARN en las muestras de plasma pre-enfermedad pueden predecir y discriminar el desarrollo de los tumores metastásicos tempranos más agresivos que con frecuencia son indetectables por tomografías computarizadas en espiral anuales. Esta información podría ser ciertamente útil para incitar a estas personas a participar en programas farmacológicos para dejar de fumar y posiblemente para proponer imágenes más específicas para la detección de enfermedad metastásica oculta (por ejemplo, PET, resonancia magnética de cuerpo completo), así como tratamientos no tóxicos, como la inscripción a programas de vacunación profiláctica. Además, la firma de una enfermedad

potencialmente agresiva también podría ayudar en el manejo clínico de los nódulos frecuentes en etapa temprana detectados durante los ensayos de cribado por tomografía computarizada que mejoran los algoritmos de diagnóstico.

- 5 Teniendo en cuenta las características no invasivas del muestreo de plasma y la detección reproducible y fácil de los marcadores de miARN, los biomarcadores de miARN a base de plasma pueden utilizarse en la práctica clínica y pueden ayudar a evitar el sobrediagnóstico y el sobretratamiento de enfermedades de bajo riesgo y la detección tardía de la detección de alto riesgo y enfermedad metastásica temprana (Boeri et al., Proc Natl Acad Sci US A. 108 (9): 3713-8,2011)

#### Materiales y métodos

- 10 Protocolos de cribado de TC. En la cohorte de detección INT/IEO de 1,035 fumadores empedernidos de alto riesgo, la edad promedio fue de 58 años (intervalo 50-84), 739 (71%) eran hombres, el consumo promedio de tabaco fue de 26 cigarrillos diarios durante 37 años (paquete mediano/años = 40), y el 14% eran exfumadores.

- 15 Se evaluaron los siguientes parámetros clínicos: edad, sexo, índice de paquete/años, ventilación espiratoria forzada en 1 s (VRF1%), año de TC, etapa patológica de cánceres detectados, histología, tamaño, tasa de crecimiento, valor de absorción estándar (VAE) de PET. La prueba  $\chi^2$  se utilizó para examinar las asociaciones entre las variables predictoras. Las curvas de supervivencia general (SG) de los pacientes con cáncer de pulmón se estimaron con el método de Kaplan-Meier y se compararon con la prueba de *log-rank*, utilizando el tiempo desde el inicio del cáncer de pulmón hasta la muerte o censurando en la última fecha de seguimiento. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) y el programa R. Los valores de P de ambos lados <0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

- 20 El segundo ensayo fue un ensayo prospectivo aleatorizado denominado ensayo multicéntrica de detección pulmonar italiana (MDPI) lanzado en 2005 (ensayo MDPI, conjunto de validación). Los fumadores actuales o anteriores, de al menos 50 años y sin antecedentes de cáncer en los 5 años anteriores, fueron asignados al azar en dos grupos de estudio: un grupo de control sometido a un programa de prevención primaria con evaluación de prueba de función pulmonar y un grupo de detección precoz donde TC en espiral periódicamente se asoció con la prevención primaria y  
25 la evaluación de la prueba de función pulmonar. El grupo de detección temprana se aleatorizó aún más en dos brazos: tomografía computarizada en espiral de dosis baja anual versus tomografía computarizada en espiral cada 2 años. Un total de 2,352 sujetos fueron asignados al azar en uno de los dos brazos de detección de tomografía computarizada.

- 30 Durante la inscripción y la revisión anual de todos los voluntarios en ambos ensayos, se recolectó sangre total en tubos de vacío con EDTA y plasma inmediatamente separados por dos etapas de centrifugación a 1,258 fuerza centrífuga relativa X ga 4°C y se almacenaron en un banco biológico, con soporte mediante una base de datos que registra toda la información clínica y epidemiológica. También se recogieron muestras de tejido de tumores pulmonares y tejido pulmonar normal correspondiente (muestreado a distancia de la lesión cancerígena) cuando estaba disponible de pacientes sometidos a resecciones quirúrgicas. Las muestras de tejido y plasma se obtuvieron de acuerdo con la Revisión interna y las Juntas de ética del Istituto Nazionale Tumori de Milán.

- 35 Análisis de microarreglos de miARN en muestras de tejido

- 40 Para los análisis de expresión, utilizamos primero un conjunto de 28 tumores primarios de pulmón congelados detectados por tomografía computarizada en espiral y 24 tejidos pulmonares normales pareados, recolectados durante el ensayo INT/IEO. El etiquetado de miARN y la hibridación se realizaron utilizando 5 µg de ARN extraído con TRIzol total (Invitrogen). El microarreglo de miARN (Ohio State University Comprehensive Cancer Center, versión 2.0) utilizó sondas contenidas para 460 miARNs maduros detectados por cuadruplicado (235 *Homo sapiens*, 222 *Mus musculus* y tres *Arabidopsis thaliana*) con sitios activos anotados seleccionados para el diseño de oligonucleótidos. Las señales de hibridación se detectaron con un conjugado de estreptavidina-Alexa-647, y las imágenes escaneadas (escáner Perkin-Elmer ScanArray XL5K) se cuantificaron utilizando el software GeneSpring versión 7.2 (Silicon Genetics, Redwood City, CA).

- 45 Análisis estadísticos y bioinformáticos en muestras de tejido

En los chips de microarreglos, después de la sustracción de fondo y la transformación de los datos (para convertir cualquier valor negativo a 0.01), el valor promedio de los cuatro puntos se normalizó utilizando un método de percentil 50 por chip que normaliza cada chip con su mediana.

- 50 La comparación de clase y análisis de predicción de clase. Los análisis estadísticos se realizaron con el software BRB ArrayTools 3.8.1 desarrollado por el Dr. Richard Simon en el Instituto Nacional del Cáncer. El microARN expresado diferencialmente entre dos clases se consideró significativo al nivel nominal de 0.001-0.003 de la prueba univariante basada en 10,000 permutaciones aleatorias y se utilizaron para el análisis de predicción de clase con la herramienta de métodos múltiples.

#### Perfiles de miARN en muestras de plasma

5 El perfil de expresión de miARN se realizó en 40 muestras de plasma, recolectadas 12-28 meses antes y en el momento de la detección de la enfermedad, de 19 pacientes en el conjunto de entrenamiento y en 34 muestras de plasma de 22 pacientes del conjunto de validación. Utilizando mirVana PARISKit (Ambion), se extrajo el ARN total de muestras de plasma de 200  $\mu$ l, y se determinó la expresión de miARN utilizando el protocolo de Megaplex Pools en la tarjeta microfluidica tipo A (Applied Biosystems). Los grupos control estaban representados por 15 grupos de 5-7 muestras de plasma, cada uno de individuos libres de enfermedad inscritos en los mismos ensayos y emparejados con los pacientes por sexo, edad y hábito de fumar. Para cada tarjeta microfluidica (muestra), el U<sub>c</sub> de cada miARN se determinó utilizando el programa SDS 2.2.2 (Applied Biosystems) y estableciendo un umbral de 0.2 y una línea de base manual de 3 a 18 ciclos.

10 PCR cuantitativa en tiempo real. Tejidos

A partir de 20 ng del ARN total en el paso de transcripción inversa (TR), se utilizaron los ensayos de microARN TaqMan (Applied Biosystems) para la PCR cuantitativa en tiempo real siguiendo su procedimiento estándar. La cuantificación relativa se realizó utilizando el método AACt utilizando como constitutivo a el miARN RNU-6B.

15 Muestras de plasma. A partir de 3  $\mu$ l del mismo ARN de circulación libre de plasma utilizado para el Protocolo de piscinas Megaplex (Applied Biosystems), los miARN seleccionados se validaron con el protocolo de Megaplex Pools (Applied Biosystems).

#### Resultados

20 La Figura 15 muestra la consistencia de la medición de la expresión de miARN en muestras de plasma mediante PCR cuantitativa en tiempo real considerando solo los 100 miARNs seleccionados para el análisis de comparación de clases. (A) Se realizaron duplicados técnicos para dos muestras de pacientes (341 y 380) y para un grupo control (M2). La representación gráfica se realizó trazando los primeros valores de miARN obtenidos en la abscisa (duplicado A) y los valores obtenidos en la segunda evaluación en la ordenada (duplicado B). El valor de regresión lineal muestra una buena reproducibilidad de las mediciones. (B) Correlación entre dos grupos de control diferentes. (C) Representación gráfica de los valores promedio de todos los coeficientes de correlación de Pearson entre grupos control, duplicados técnicos y entre todas las muestras de pacientes (antes y en el momento de la enfermedad).

25

## REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar una presencia real de un tumor pulmonar en un individuo o un sujeto en riesgo de sufrir un tumor pulmonar, que comprende:
- 5 determinar el nivel de expresión de los miARNs hsa-miR-660, hsa-miR-197 y hsa-miR-92a en una muestra biológica de un sujeto, en el que la muestra biológica es sangre total, una fracción de sangre, plasma o suero; calculando proporciones entre el nivel de expresión de pares de miARNs hsa-miR-197/hsa-miR-92a y hsa-miR-197/hsa-miR-660;
- comparar cada una de las proporciones con una proporción de control respectiva representada por las proporciones del nivel de expresión de los pares de miARNs obtenidos de una muestra biológica de control de un sujeto libre de enfermedad, y determinar cuál de las proporciones se desvía de sus valores de control respectivos;
- 10 en el que el individuo se define como que presenta un tumor pulmonar o está en riesgo de un tumor pulmonar si el 100% de las proporciones se desvían con respecto a los valores de control respectivos.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el método para determinar una presencia real de un tumor pulmonar en un individuo que comprende, además:
- determinar el nivel de expresión de miARN hsa-miR-106a; y
- 15 calcular las proporciones entre el nivel de expresión de los pares de miARNs hsa-miR-106a/hsa-miR-92a, hsa-miR-106a/hsa-miR-660 y hsa-miR-106a/hsa-miR-197.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende, además:
- determinar el nivel de expresión de miARNs hsa-miR-142-3p, hsa-miR-28-3 y hsa-miR-140-5; y calcular las proporciones entre el nivel de expresión de pares de miARNs hsa-miR-140-5p/hsa-miR-197, hsa-miR-140-5p/hsa-miR-28-3p, hsa-miR-142-3p/hsa-miR-197, hsa-miR-142-3p/hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-3p/hsa-miR-660 y hsa-miR-28-3p/hsa-miR-92a.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende, además:
- determinar el nivel de expresión de los miARNs hsa-miR-17, hsa-miR-19b, hsa-miR-101, hsa-miR-145, hsa-miR-320, hsa-miR-126 y hsa-miR-148a; y
- 25 calcular las proporciones entre el nivel de expresión de los pares de miARNs hsa-miR-101/hsa-miR-660, hsa-miR-101/hsa-miR-92a, hsa-miR-106a/hsa-miR-320, hsa-miR-126/hsa-miR-660, hsa-miR-126/hsa-miR-92a, hsa-miR-142-3p/hsa-miR-145, hsa-miR-145/hsa-miR-660, hsa-miR-145/hsa-miR-92a, hsa-miR-148a/hsa-miR-660, hsa-miR-148a/hsa-miR-92a, hsa-miR-17/hsa-miR-320, hsa-miR-17/hsa-miR-660, hsa-miR-17/hsa-miR-92a, hsa-miR-197/hsa-miR-320, hsa-miR-19b/hsa-miR-660, hsa-miR-19b/hsa-miR-92a.
- 30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el método para determinar a un sujeto en riesgo de un tumor pulmonar que comprende, además:
- determinar del nivel de expresión de los miARNs hsa-miR-17, hsa-miR-451, hsa-miR-19b, hsa-miR-106a, hsa-miR-101, hsa-miR-97, hsa-miR-133a, hsa-miR-16, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-15b, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-126, hsa-miR-28-3p y hsa-miR-320; y
- 35 calcular una pluralidad de proporciones entre el nivel de expresión de pares de miARNs hsa-miR-17/hsa-miR-660, hsa-miR-17/hsa-miR-92a, hsa-miR-197/hsa-miR-451, hsa-miR-17/hsa-miR-451, hsa-miR-19b/hsa-miR-660, hsa-miR-197/hsa-miR-19b, hsa-miR-19b/hsa-miR-451, hsa-miR-106a/hsa-miR-660, hsa-miR-106a/hsa-miR-451, hsa-miR-106a/hsa-miR-92a, hsa-miR-101/hsa-miR-97, hsa-miR-101/hsa-miR-17, hsa-miR-133a/hsa-miR-660, hsa-miR-133a/hsa-miR-451, hsa-miR-101/hsa-miR-133a, hsa-miR-16/hsa-miR-660, hsa-miR-16/hsa-miR-451, hsa-miR-140-3p/hsa-miR-660, hsa-miR-101/hsa-miR-140-3p, hsa-miR-15b/hsa-miR-451, hsa-miR-15b/hsa-miR-660, hsa-miR-142-3p/hsa-miR-15b, hsa-miR-126/hsa-miR-660, hsa-miR-28-3p/hsa-miR-660 y hsa-miR-320/hsa-miR-660.
- 40 6. El método de la reivindicación 1, en el que dicho tumor no puede detectarse mediante exploración por TC en espiral o en el que dicha determinación de la presencia de dicho tumor confirma la detección mediante TC en espiral.
7. Un método para determinar la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo que comprende:
- 45 determinar del nivel de expresión de los miARNs hsa-miR-197, hsa-miR-451 y hsa-miR-486-5p en la muestra biológica de un sujeto, en el que la muestra biológica es sangre total, una fracción de sangre, plasma o suero;
- calcular una pluralidad de proporciones entre el nivel de expresión de pares de miARNs hsa-miR-197/hsa-miR-451 y hsa-miR-197/hsa-miR-486-5p;

comparar cada una de las proporciones con una proporción de control respectiva representada por las proporciones del nivel de expresión de los pares de miARNs obtenidos de una muestra biológica de control de un sujeto libre de enfermedad, y determinar cuál de las proporciones se desvía de sus valores de control respectivos;

5 en el que el individuo se define como que presenta un tumor pulmonar agresivo si el 100% de las proporciones se desvían con respecto a los valores de control respectivos.

8. El método de la reivindicación 6, que comprende, además:

10 determinar del nivel de expresión de los miARNs hsa-miR-106a, hsa-miR-17, hsa-miR-126, hsa-miR-660, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-19b, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-16, hsa-miR-92a, hsa-miR-101, hsa-miR-145, hsa-miR-148a, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-30b, hsa-miR-15b, hsa-miR-30c y hsa-miR-21 en la muestra biológica de un sujeto, en donde la muestra biológica es sangre total, una fracción de sangre, plasma o suero;

15 calcular una pluralidad de proporciones entre el nivel de expresión de los pares de miARNs hsa-miR-106a/hsa-miR-197, hsa-miR-106a/hsa-miR-451, hsa-miR-106a/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-126/hsa-miR-197, hsa-miR-126/hsa-miR-451, hsa-miR-126/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-17/hsa-miR-197, hsa-miR-17/hsa-miR-451, hsa-miR-17/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-101/hsa-miR-197, hsa-miR-126/hsa-miR-660, hsa-miR-140-5p/hsa-miR-197, hsa-miR-140-5p/hsa-miR-28-3p, hsa-miR-142-3p/hsa-miR-197, hsa-miR-145/hsa-miR-451, hsa-miR-148a/hsa-miR-451, hsa-miR-15b/hsa-miR-451, hsa-miR-16/hsa-miR-197, hsa-miR-197/hsa-miR-19b, hsa-miR-197/hsa-miR-21, hsa-miR-197/hsa-miR-660, hsa-miR-197/hsa-miR-92a, hsa-miR-19b/hsa-miR-451, hsa-miR-19b/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-19b/hsa-miR-660, hsa-miR-28-3p/hsa-miR-451, hsa-miR-28-3p/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-28-3p/hsa-miR-660, hsa-miR-30b/hsa-miR-451 y hsa-miR-30c/hsa-miR-451.

20 9. Un método para determinar la presencia real de un tumor pulmonar agresivo en un individuo que comprende:

determinar el nivel de expresión de los miARNs hsa-miR-660, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-19b, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-21 y hsa-miR-221 en la muestra biológica de un sujeto, en donde la muestra biológica es sangre total, una fracción de sangre, plasma o suero;

25 calcular una pluralidad de proporciones entre el nivel de expresión de los pares de miARNs hsa-miR-142-3p/hsa-miR-19b, hsa-miR-142-3p/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-19b/hsa-miR-21, hsa-miR-19b/hsa-miR-221, hsa-miR-21/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-21/hsa-miR-660, hsa-miR-221/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-221/hsa-miR-660 y hsa-miR-142-3p/hsa-miR-660;

30 comparar cada una de las proporciones con una proporción de control respectiva representada por las proporciones del nivel de expresión de los pares de miARN obtenidos de la muestra biológica de control de un sujeto libre de enfermedad, y determinar cuál de las proporciones se desvía de sus valores de control respectivos;

en donde el individuo se define como que presenta un tumor pulmonar agresivo si el 100% de las proporciones se desvían con respecto a los valores de control respectivos.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende, además:

35 determinar el nivel de expresión de miARNs hsa-miR-148a, hsa-miR-15b, hsa-miR-30b y hsa-miR-16; y calcular las proporciones entre el nivel de expresión de pares de miARNs hsa-miR-148a/hsa-miR-19b, hsa-miR-148a/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-15b/hsa-miR-19b, hsa-miR-15b/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-16/hsa-miR-486-5p, hsa-miR-19b/hsa-miR-30b y hsa-miR-30b/hsa-miR-486-5p.

11. Un método para determinar a un sujeto en riesgo de un tumor pulmonar agresivo, que comprende:

40 determinar el nivel de expresión de los miARNs hsa-miR-197, hsa-miR-101 y hsa-miR-451 en la muestra biológica de un sujeto, en donde la muestra biológica es sangre total, una fracción de sangre, plasma o suero;

calcular proporciones entre el nivel de expresión de pares de miARNs hsa-miR-101/hsa-miR-197 y hsa-miR-197/hsa-miR-451;

45 comparar cada una de las proporciones con una proporción de control respectiva representada por las proporciones del nivel de expresión de los pares de miARN obtenidos de una muestra biológica control de un sujeto libre de enfermedad, y determinar cuál de las proporciones se desvía de sus valores de control respectivos;

en el que el individuo está en riesgo de un tumor pulmonar agresivo si el 100% de las proporciones se desvían con respecto a los valores de control respectivos.

12. El método de la reivindicación 11, que comprende además:

50 determinar del nivel de expresión de los miARNs hsa-miR-28-3p, hsa-miR-21, hsa-miR-106a, hsa-miR-16, hsa-miR-17, hsa-miR-92a, hsa-miR-30c, hsa-miR-320, hsa-miR-221, hsa-miR-145, hsa-miR-30b, hsa-miR-19b, hsa-miR-126, hsa-miR-15b, hsa-miR-148a y hsa-miR-140-3p; y



- calcular una pluralidad de proporciones entre el nivel de expresión de los pares de miARNs hsa-miR-101/hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-3p/hsa-miR-451, hsa-miR-197/hsa-miR-21, hsa-miR-21/hsa-miR-28-3p, hsa-miR-101/hsa-miR-106a, hsa-miR-106a/hsa-miR-451, hsa-miR-106a/hsa-miR-21, hsa-miR-16/hsa-miR-28-3p, hsa-miR-16/hsa-miR-197, hsa-miR-106a/hsa-miR-16, hsa-miR-101/hsa-miR-17, hsa-miR-17/hsa-miR-451, hsa-miR-17/hsa-miR-21, hsa-miR-16/hsa-miR-17, hsa-miR-28-3p/hsa-miR-92a, hsa-miR-197/hsa-miR-92a, hsa-miR-197/hsa-miR-30c, hsa-miR-28-3p/hsa-miR-30c, hsa-miR-320/hsa-miR-92a, hsa-miR-320/hsa-miR-451, hsa-miR-221/hsa-miR-451, hsa-miR-21/hsa-miR-221, hsa-miR-145/hsa-miR-197, hsa-miR-145/hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-3p/hsa-miR-30b, hsa-miR-197/hsa-miR-30b, hsa-miR-19b/hsa-miR-451, hsa-miR-126/hsa-miR-451, hsa-miR-15b/hsa-miR-451, hsa-miR-148a/hsa-miR-197 y hsa-miR-140-3p/hsa-miR-451.
- 5
- 10 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tumor pulmonar es cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), adenocarcinoma pulmonar (ADC), carcinoma broncoalveolar (CBA), carcinoma de pulmón de células escamosas (CCE) o carcinoma de células grandes (CCG).
- 15 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica se origina de un fumador que, en el momento de la recolección de la muestra, no presenta un tumor pulmonar si se somete a métodos de diagnóstico por imagen, en particular el individuo fumador que no presenta nódulos de dimensiones superiores a 5 mm si se somete a una TC en espiral.
- 20 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra de control biológico obtenida de dicho sujeto hasta tres años antes del diagnóstico.

Figura 1

	Conjunto de entrenamiento Ensayo INT-IEO N=18	Conjunto de validación Ensayo MDPI N=22
Género		
Hombre	11 (61.1%)	16 (72.7%)
Mujer	7 (38.9%)	6 (27.3%)
Edad (años)	57.5 ± 5.6 (s.d.)	61.9 ± 7 (s.d.)
El hábito de fumar (índice paquetes/año)	60.3 ± 23.8 (s.d.)	55 ± 21 (s.d.)
Año de cribado de la detección de la enfermedad		
1er. año	1 (5.6%)	
2do. año	6 (33.3%)	5 (22.7%)
3er. y 5to. año	11 (61.1%)	14 (63.6%)
Cánceres de intervalo		3 (13.7%)
Hisotipo		
ADC (adenocarcinoma)		14 (63.6%)
CCE (carcinoma de células escamosas)	13 (72.2%)	4 (18.2%)
Otro	3 (16.7%)	4 (18.2%)
3 (11.1%)		
Estadio		
Ia-IIb	11 (61.1%)	15 (68.2%)
II-III-IV	7 (38.9%)	7 (31.8%)
Mediana de seguimiento (meses)	67*	14 (min = 4, max =46)
Pronóstico		
Libre de enfermedad	10 (55.6%)	16 (72.7%)
Vivo con enfermedad		1 (4.6%)
Muerto	8 (44.4%)	5† (22.7%)
Grupos control ‡	5 (5-7 muestras)	10 (5-7 muestras)

\* un valor atípico tiene un seguimiento de 35 meses

† un sujeto falleció por complicaciones clínicas

‡ individuos libres de enfermedad agrupados por sexo, edad y hábito de fumar para que coincidan mejor con las características de los pacientes

Figura 2

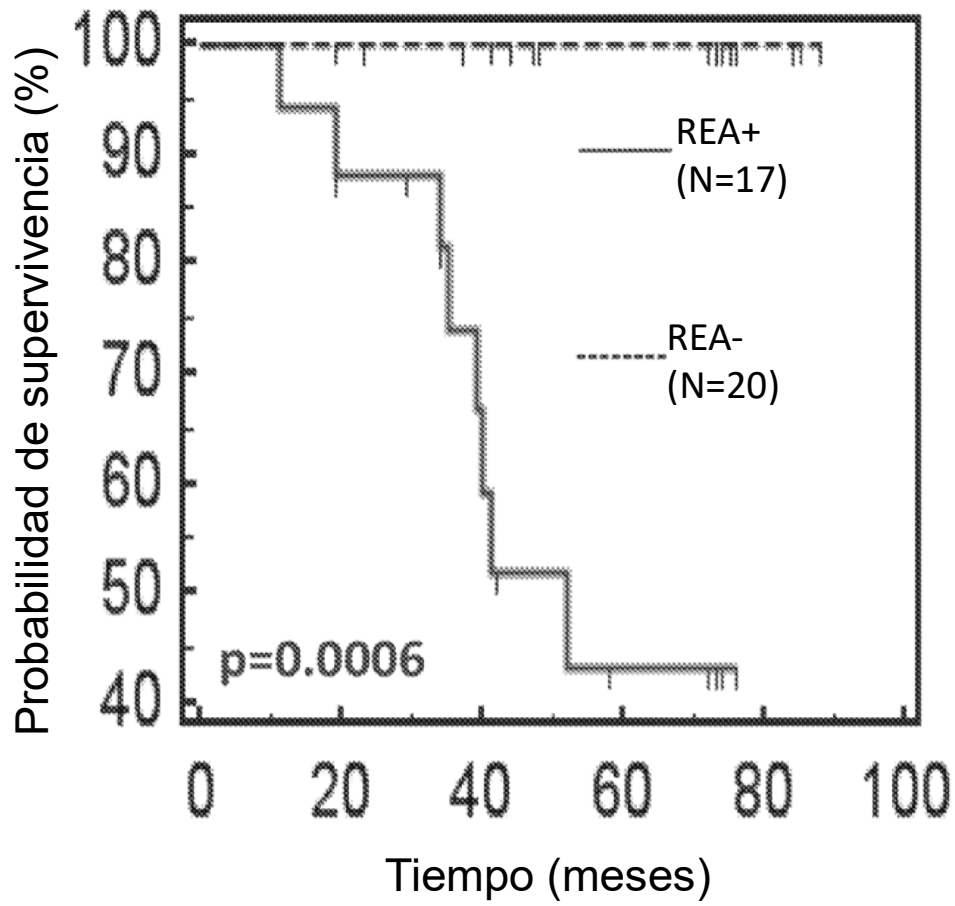


Figura 3

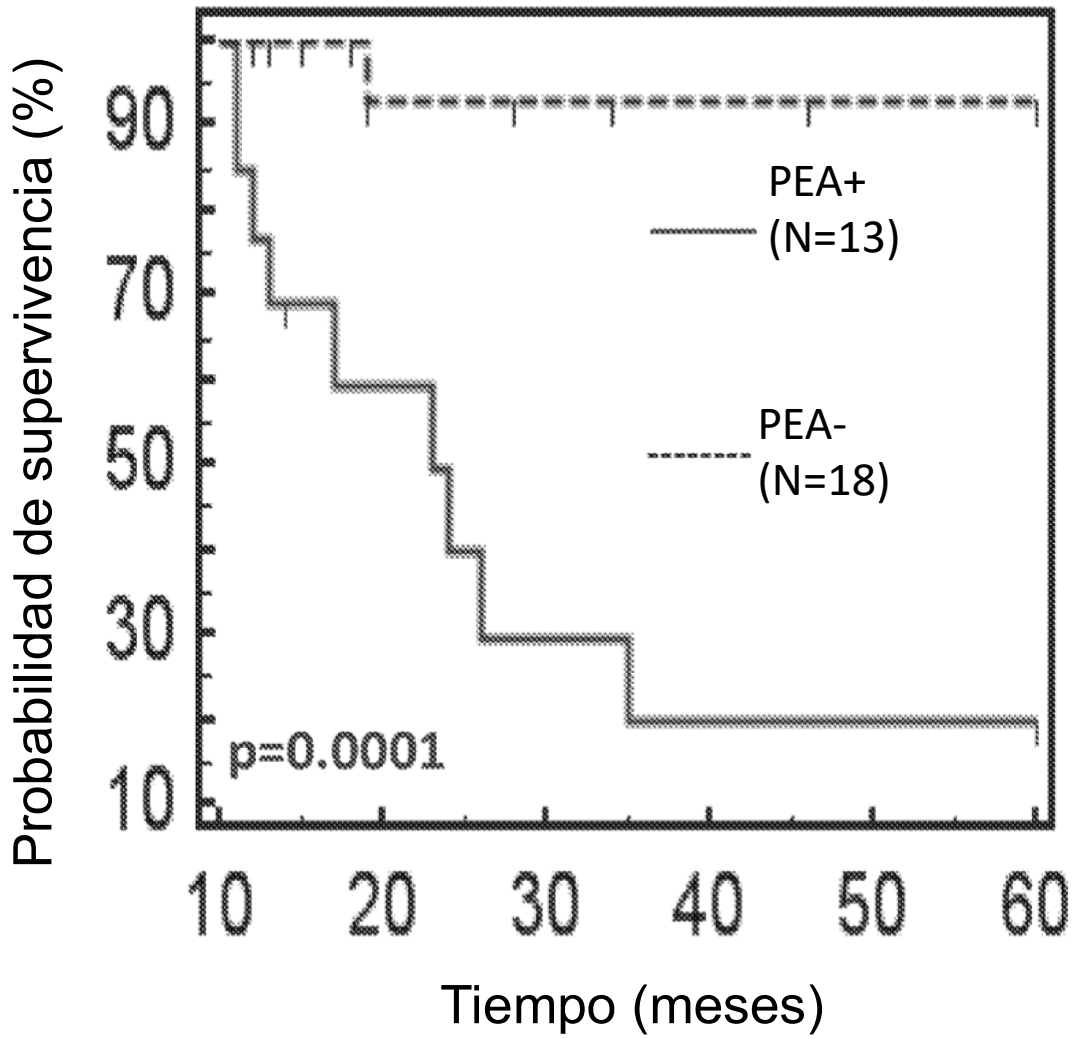


Figura 4

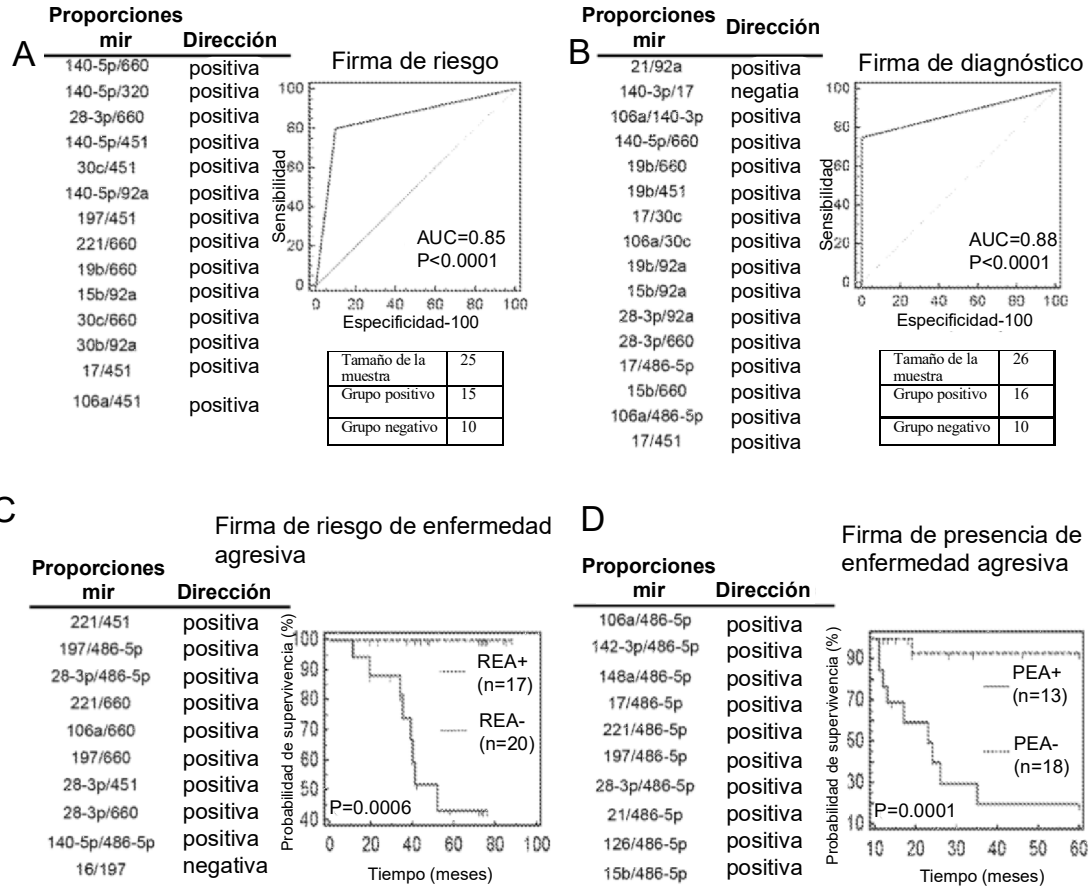


Figura 5. Riesgo de manifestar un tumor pulmonar –  
Conjunto de validación

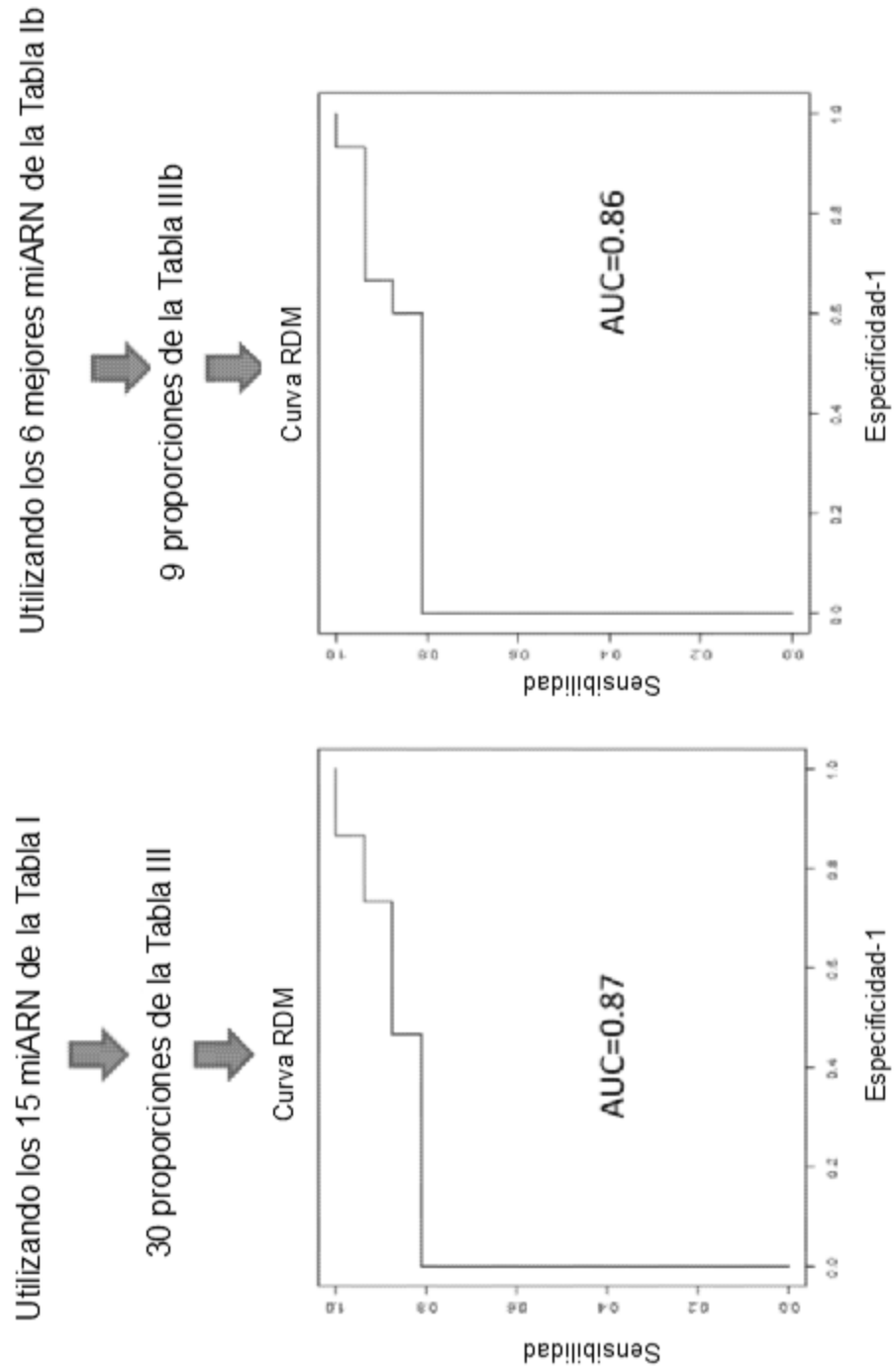


Figura 6. Riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo –  
Conjunto de validación

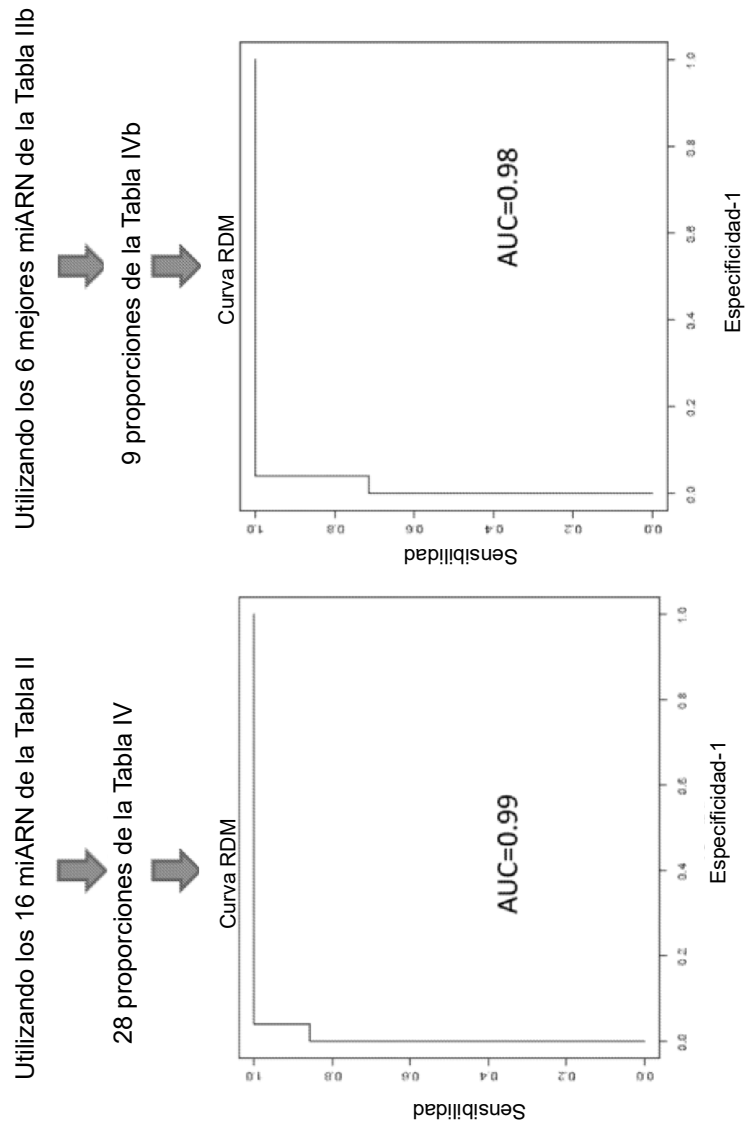


Figura 7. Riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo –  
Conjunto de validación

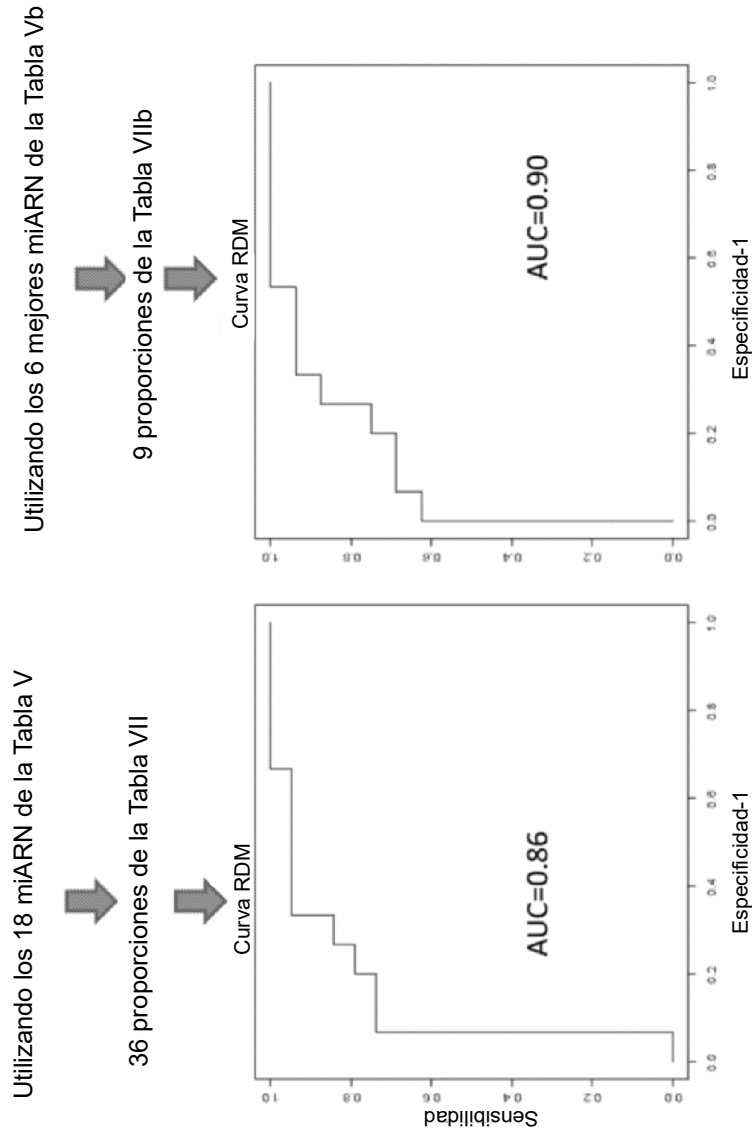




Figura 8. Riesgo de manifestar un tumor pulmonar agresivo –  
Conjunto de validación

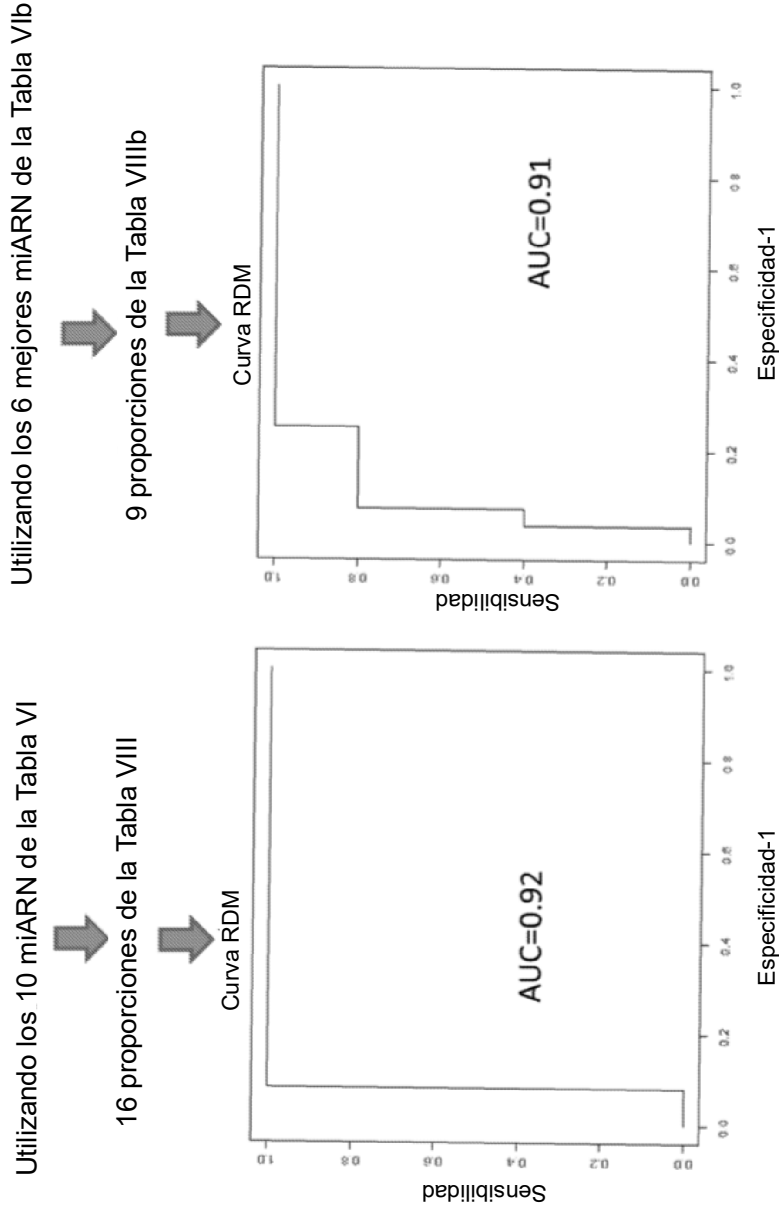


Figura 9

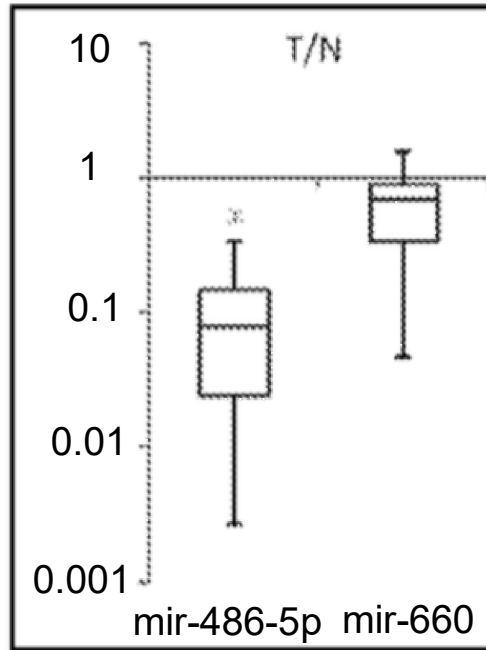


Figura 10

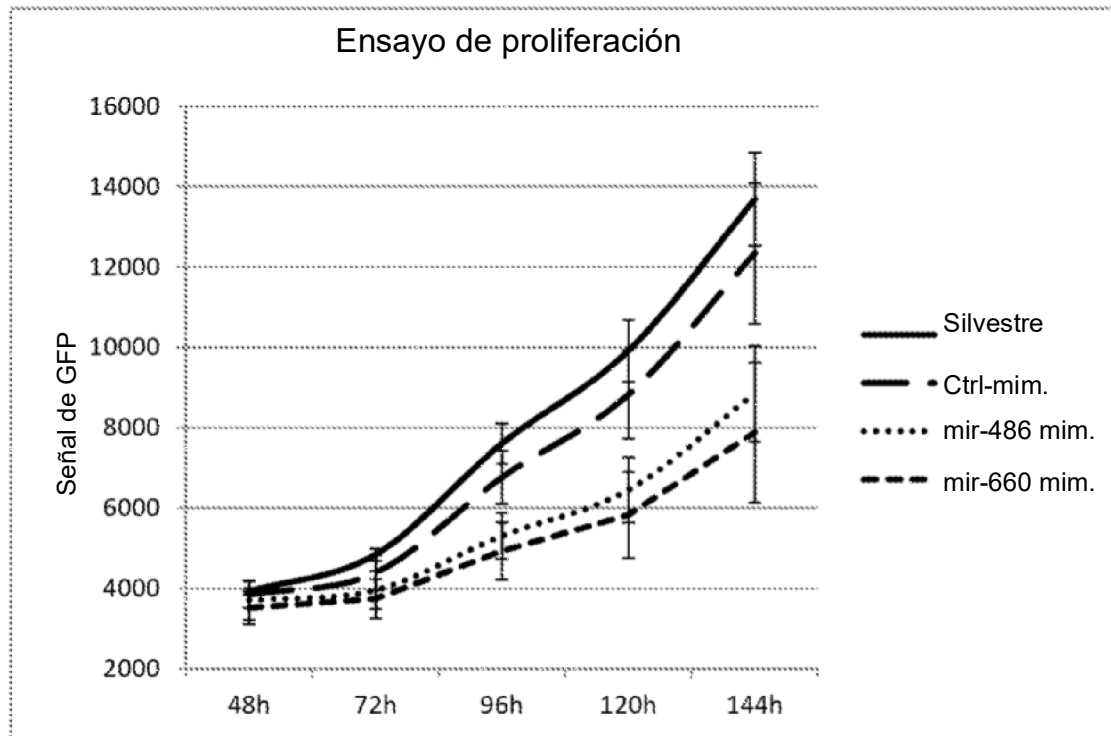


Figura 11

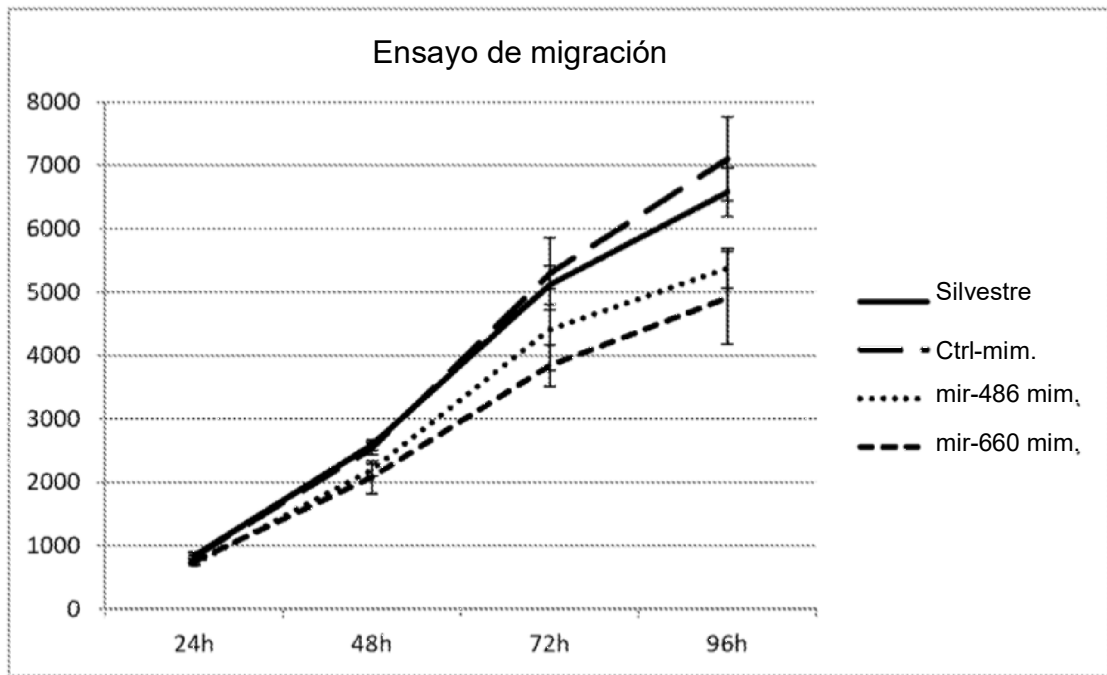


Figura 12

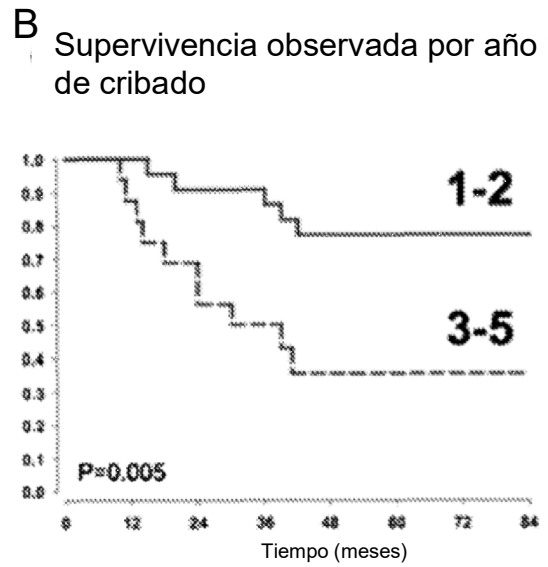
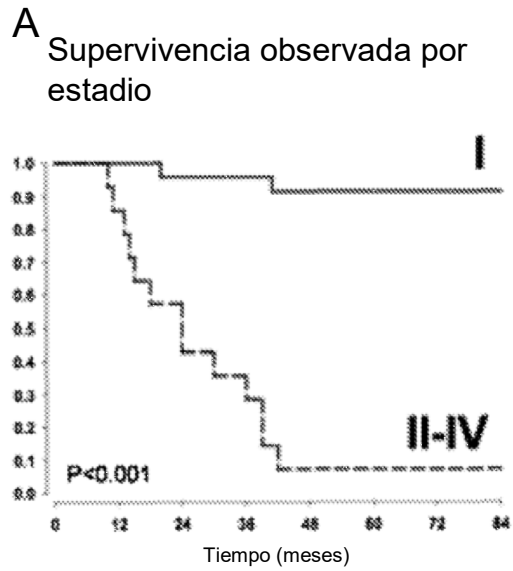


Figura 13

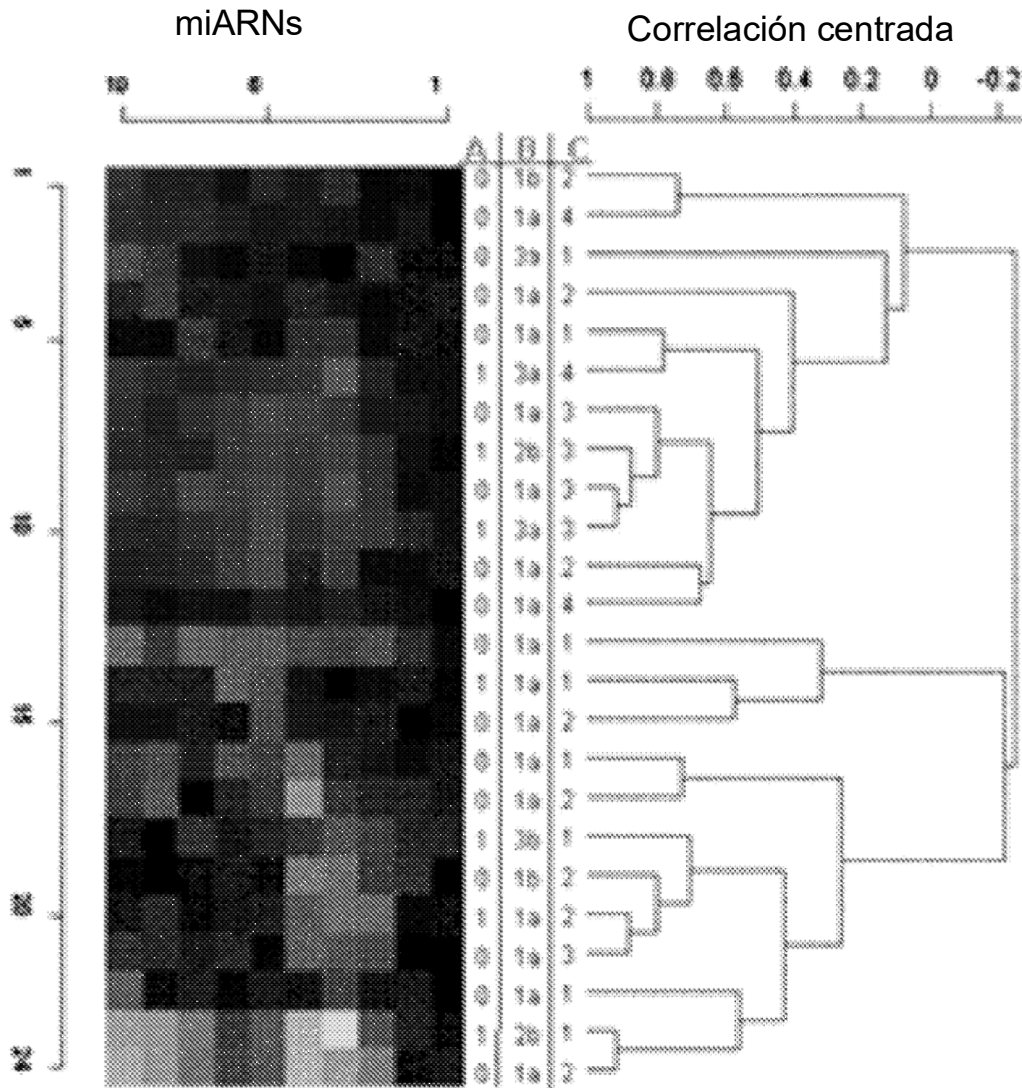


Figura 14

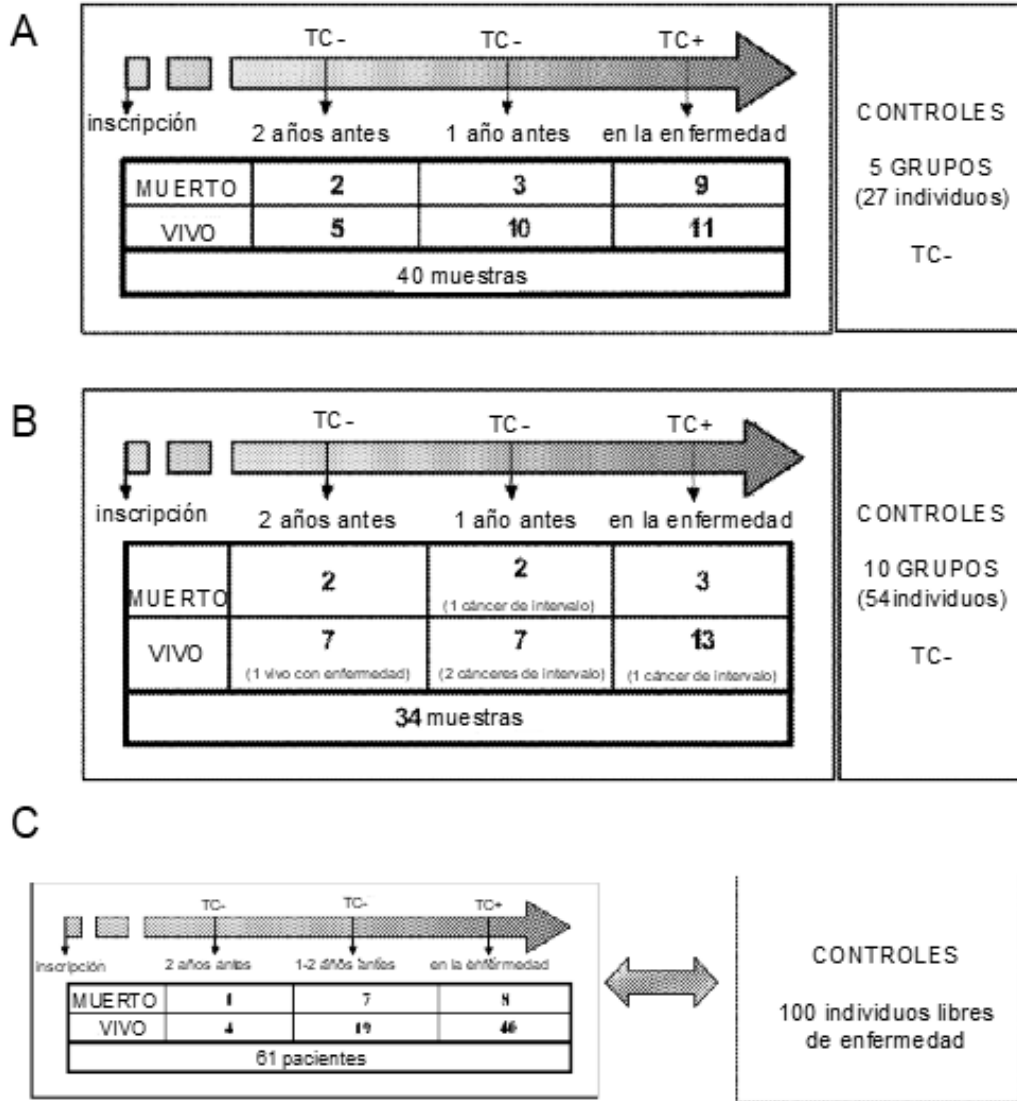


Figura 15

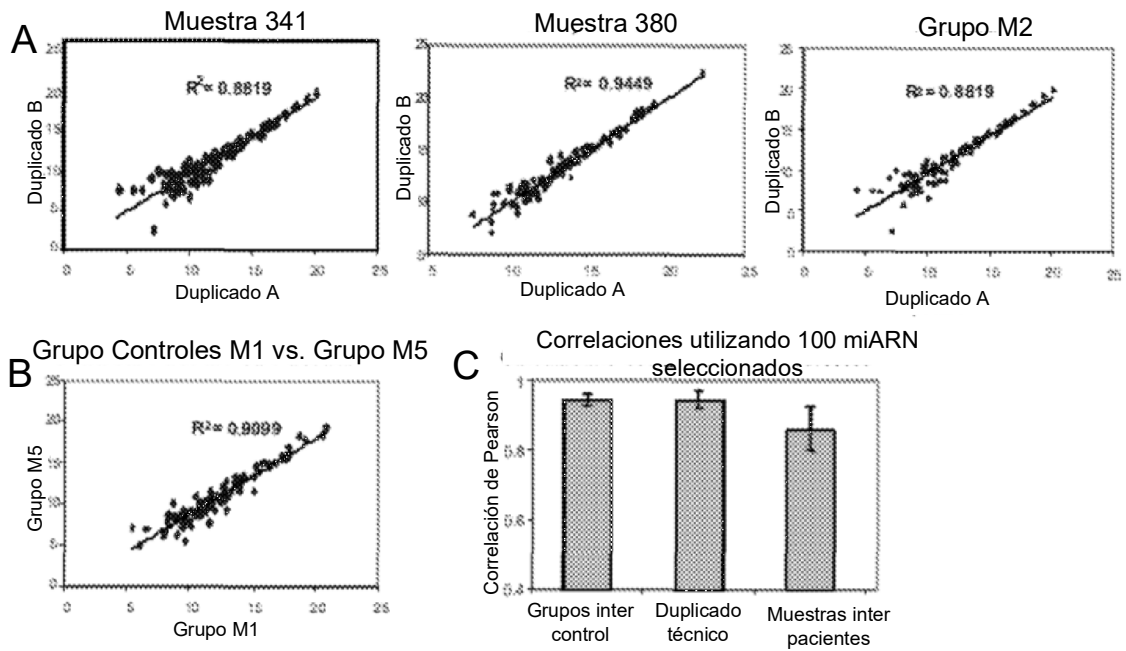
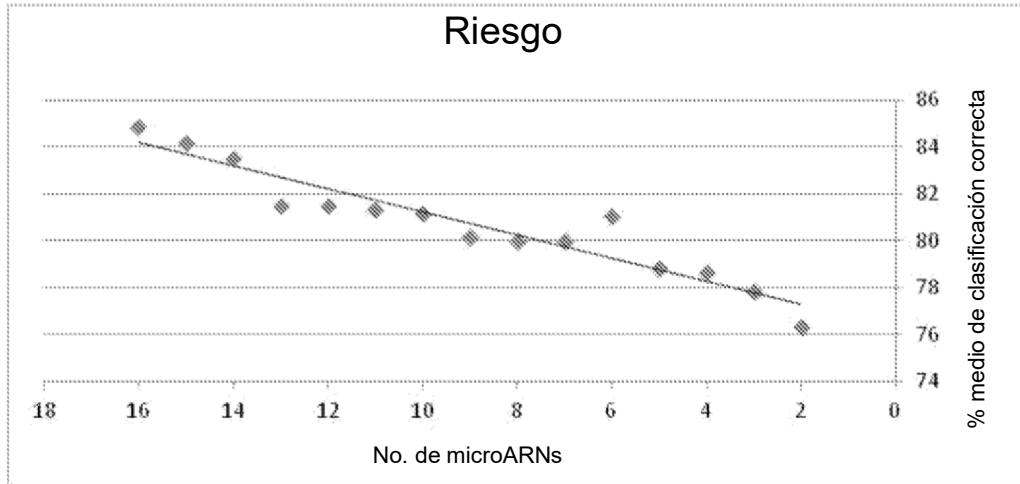




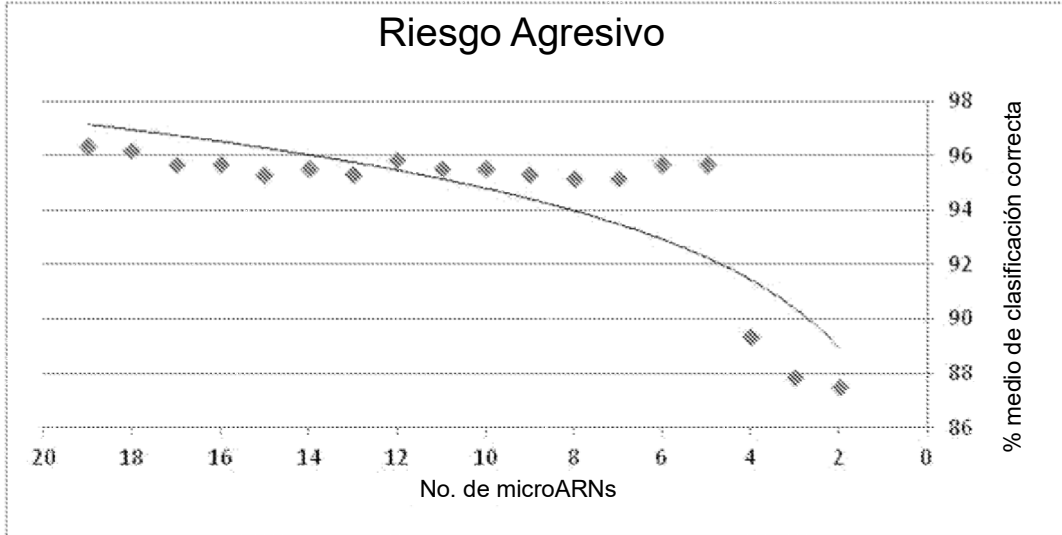
Figura 16

A



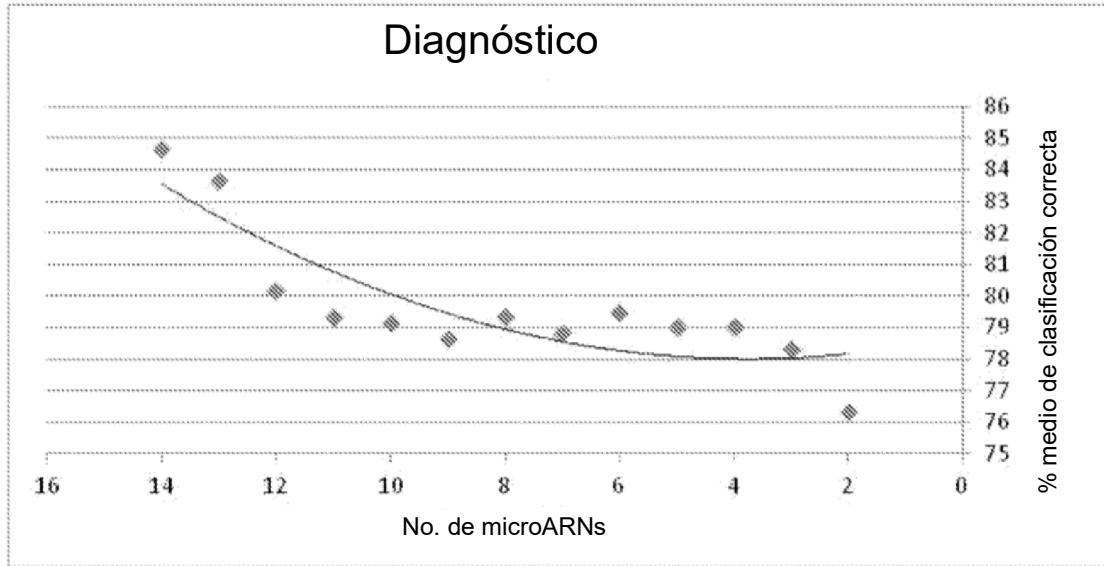
No. de microARNs	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
No. de proporciones	27	26	25	24	23	21	19	17	14	12	9	6	4	2	1

B



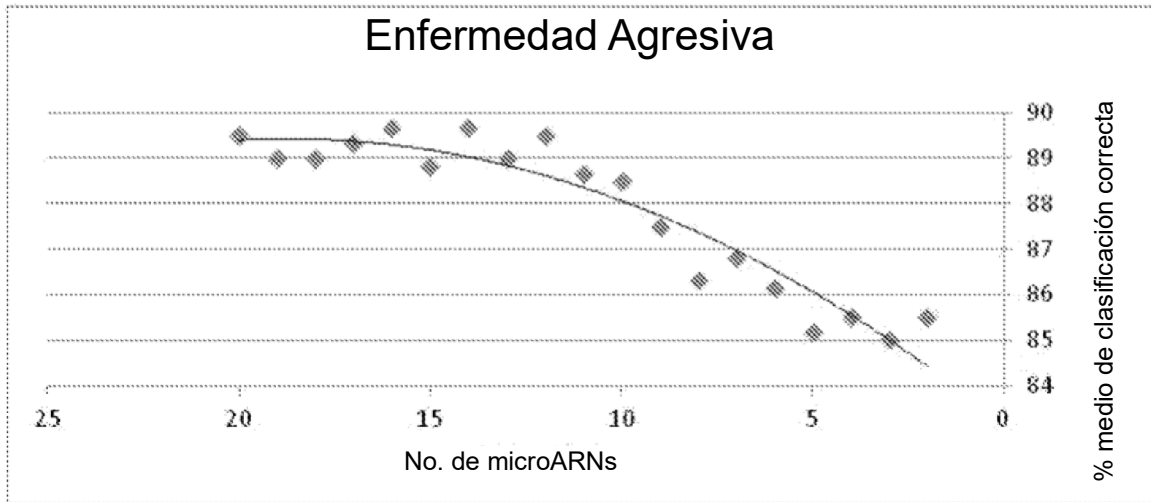
No. de proporciones	33	32	31	30	29	28	26	24	22	20	18	16	12	9	6	4	2	1
No. de microARNs	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2

C



No. de proporciones	27	25	23	21	19	16	13	11	7	6	5	2	1
No. de microARNs	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2

D



No. de proporciones	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22	20	16	13	11	8	5	2	1
No. de microARNs	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2

Figura. 17

