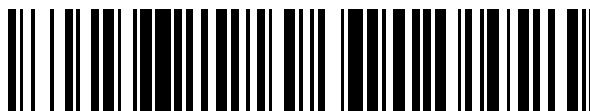


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 651**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2016 PCT/DK2016/050032**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16127998**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2016 E 16706303 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3256602**

54 Título: **Método basado en microARN para la detección temprana de cáncer de próstata en muestras de orina**

30 Prioridad:

11.02.2015 DK 201500079
21.12.2015 DK 201500825

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2020

73 Titular/es:

REGION, MIDTJYLLAND (33.3%)
Skottenborg 26
8800 Viborg, DK;
QIAGEN GMBH (33.3%) y
AARHUS UNIVERSITET (33.3%)

72 Inventor/es:

THOMSEN, RØNFELDT, ANNI;
FREDSØE, JACOB, CHRISTIAN;
SØRENSEN, DALSGAARD, KARINA;
KONGSBK, LARS;
MOURITZEN, PETER y
ØRNTOFT, TORBEN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 749 651 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

Método basado en microARN para la detección temprana de cáncer de próstata en muestras de orina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para reducir el problema de sobrediagnóstico en cáncer de próstata. Midiendo el nivel de unos pocos biomarcadores de microARN característicos en orina, el método puede preseleccionar individuos con cáncer de próstata que pueden beneficiarse de procedimientos de diagnóstico invasivos adicionales.

Antecedentes de la invención

El cáncer de próstata (CP) es un tumor maligno que se origina en la próstata y es la neoplasia maligna más comúnmente diagnosticada y tratada y es una de las principales causas de muerte relacionada con el cáncer entre hombres en países occidentales (1). Aproximadamente a 1 de cada 6 hombres se le diagnosticará cáncer de próstata durante el transcurso de su vida y la mayoría de los hombres ancianos finalmente desarrollarán la enfermedad.

En el momento del diagnóstico, la mayoría de los hombres tienen cáncer de próstata localizado (cáncer confinado a la próstata) con pronóstico excelente. Aproximadamente el 5% de los hombres se les diagnostica cáncer avanzado o distante que se ha diseminado por todo el cuerpo. Para estos hombres, la tasa de supervivencia relativa a 5 años es sólo del 29%. Sin embargo, la detección temprana de CP es crucial ya que el tratamiento curativo sólo es posible para CP no metastásico.

El CP se diagnostica normalmente basándose en los niveles de antígeno prostático específico (PSA) sérico aumentados seguido por la inspección histopatológica de biopsias por punción. El uso de PSA para la detección de CP, sin embargo, se asocia con tasas considerables de falsos positivos. Usando un punto de corte de PSA de 4,0 ng/ml para el cribado, existe una tasa de falsos positivos del 65% y de falsos negativos del 20% (2). En particular, los niveles de PSA en el área de intervalo intermedia (2-10 ng/ml) presentan un área de zona gris con un valor predictivo muy bajo. Naturalmente, tales tasas han impulsado una búsqueda de otros biomarcadores, en particular biomarcadores que se encuentran en líquidos orgánicos de fácil acceso y que son relativamente económicos de evaluar. Hasta ahora, no hay conocimiento de que esta iniciativa haya sido exitosa.

Por tanto, existe una necesidad grave e insatisfecha de desarrollar métodos que puedan mejorar el diagnóstico temprano de CP y reducir el número de hombres remitidos a biopsias innecesarias. El presente estudio presenta un método de este tipo.

Una nueva clase emergente de biomarcadores potenciales para el cáncer de próstata son los microARN (miR).

Los microARN comprenden una clase de pequeños ARN reguladores no codificantes endógenos (~22 nt), que controlan la expresión génica a nivel postranscripcional en diversos organismos, incluyendo mamíferos (3). Los microARN se transcriben como transcritos de microARN primarios de tallo-bucle emparejados imperfectos largos (pri-microARN) mediante ARN polimerasa II, y se procesan además en microARN precursores de horquilla (pre-microARN) mediante la RNasa III endonucleasa nuclear, Drosha (4). Después de exportarse al citoplasma por Exportin-5-Ran-GTP, otra RNasa III endonucleasa, Dicer, escinde el pre-microARN en un dúplex de microARN de ~22 nt maduro (4). Los microARN maduros median su función mientras se incorporan en el complejo de silenciamiento inducido por microARN (miRISC). El microARN guía este complejo a los ARNm diana complementarios perfectos/casi perfectos, lo que conduce o bien a la inhibición de la traducción o bien a la degradación de ARNm (5).

Los microARN son una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras de genes, y el último lanzamiento de la miRBase (versión 21) contiene 2588 microARN humanos maduros (1881 precursores) <http://www.mirbase.org/> (6). Se ha estimado que los microARN juntos regulan hasta dos tercios de todos los ARNm humanos. Como consecuencia, los microARN influyen en numerosos procesos en la célula, por ejemplo la diferenciación celular, la progresión del ciclo celular y apoptosis y la desregulación de los microARN se relacionan a menudo con patologías humanas, incluyendo cáncer (7). De manera adicional, algunos microARN parecen ser de tipo celular y la expresión de microARN desregulada y específica de la enfermedad se ha asociado tanto con el desarrollo como con la progresión del cáncer (8). Por tanto, la expresión de microARN aberrante se ha investigado como una fuente potencial prometedora de novedosos biomarcadores para el diagnóstico temprano de cáncer (8). Además, los microARN tienen potencial para usarse como dianas de medicamentos basados en microARN para el cáncer (9). Varios estudios de obtención del perfil de microARN también han informado de microARN expresados de manera aberrante en el desarrollo y/o la progresión de CP (10). Sin embargo, la mayoría de los estudios de biomarcadores de microARN en CP publicados hasta la fecha han usado números de muestras de pacientes relativamente bajos y a menudo carecen de validación clínica independiente rigurosa para confirmar el potencial de biomarcadores de los candidatos de microARN identificados.

El documento US 2014/309130 da a conocer biomarcadores de microARN y usos de los mismos para el cribado y diagnóstico de cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna en muestras de orina. Sin embargo, el documento US 2014/309130 no da a conocer los mismos biomarcadores de microARN que la presente solicitud.

5 De manera importante, hasta donde se conoce, no ha surgido ningún método de diagnóstico basado en biomarcadores de microARN detectados en muestras no invasivas tales como orina.

10 En este caso, se realizó una obtención del perfil de miRnoma de más de 750 de los microARN más abundantes y se seleccionan los 183 microARN detectables en orina libre de células en diferentes estadios de la enfermedad (ejemplo 1). De estos 183 microARN, se identificaron microARN regulados significativamente aberrantes en pacientes con hiperplasia prostática benigna frente a pacientes con CP en los que se recogió la orina antes de la extracción de la próstata mediante prostatectomía radical (PR) (ejemplo 2). De este conjunto de datos se identificó un pequeño grupo de miR que se expresan de manera significativamente diferente en CP en relación con sujetos que no tienen CP. Además se identificó un clasificador de diagnóstico que consistía en sólo 2 microARN en la cohorte 1 y se evaluó su precisión diagnóstica. Este clasificador de 2 microARN se validó con éxito en una cohorte 2 independiente (ejemplo 3). Para investigar la robustez, se aplicó el ensayo a aún otra cohorte independiente (cohorte 3) en la que los especímenes se muestrearon y se procesaron con una metodología considerablemente diferente que la de la cohorte 1 y 2 (ejemplo 4). De manera interesante, el clasificador de 2 microARN se validó con éxito también en esta cohorte.

25 Además, como la cohorte de descubrimiento padecía limitaciones en el número de controles, parecía ventajoso combinar la cohorte 1 y la cohorte 2 para construir un clasificador con un poder estadístico más fuerte basándose en los datos combinados. Este enfoque se siguió en el ejemplo 5 y dio como resultado la identificación de un clasificador de 20-miR ligeramente diferente, pero con un AUC sorprendentemente alto de 0,99 con una especificidad del 95,5% y una sensibilidad del 93,6%.

30 El clasificador de diagnóstico de 2 miR (que implica un cálculo de razón) demostró una precisión mejorada en comparación con todos los miARN individuales sometidos a prueba. De manera interesante, todos los clasificadores identificados parecían tener una precisión significativamente mejorada en comparación con la prueba de antígeno prostático específico total (tPSA). Se ha informado que el AUC de esta prueba es tan bajo como 0,59 (11), o incluso menor (12).

35 Para confirmar la validez de los biomarcadores de microARN identificados, se incluyó un conjunto adicional de 205 muestras de CP y se repitió la construcción y validación del clasificador en dos nuevas cohortes (cohorte 4 y cohorte 5, respectivamente), en las que las muestras no cancerosas de la cohorte 1 y 2 se distribuyeron uniforme y aleatoriamente entre las dos cohortes. Además, se aplicó un método estadístico diferente para la selección del ensayo y la construcción del clasificador, junto con parámetros de filtrado de datos más rigurosos.

40 A partir de este estudio se identificaron clasificadores de diagnóstico que consistían en de 3 a 10 microARN (con una superposición significativa con los estudios previos) y se evaluó su potencial diagnóstico en la cohorte 4 (ejemplo 8). Los clasificadores se validaron con éxito en una cohorte 5 de validación independiente (ejemplo 9). Sorprendentemente, los clasificadores fueron incluso más exitosos cuando se validaron en la subpoblación de uso previsto; pacientes con niveles de PSA por debajo de 10 ng/ml (ejemplo 10).

45 Tal como se mencionó, los clasificadores basados en razón son atractivos debido a su capacidad para eludir la necesidad de ensayos de normalización, reduciéndose así el número de ensayos incluidos en la prueba. Se identificaron dos clasificadores basados en razón de este tipo que consistían cada uno en sólo tres ensayos con alto potencial diagnóstico en la cohorte 4 de descubrimiento (ejemplo 11). Los dos clasificadores basados en razón se validaron con éxito en la cohorte 5 de validación (ejemplo 12). Finalmente, estos clasificadores basados en razón se validaron en la subpoblación de uso previsto, en la que probaron ser incluso más precisos. De nuevo, tanto los clasificadores de 3-10miR como los dos clasificadores basados en razón demostraron precisión mejorada en comparación con todos los miARN individuales sometidos a prueba. De manera interesante, todos los clasificadores identificados parecían tener una precisión significativamente mejorada en comparación con la prueba de antígeno prostático específico total (tPSA). Como fue el caso para el clasificador de 2 miR del ejemplo 4, también se sometió a prueba la robustez de diagnóstico de los dos clasificadores basados en razón 3-miR en la cohorte 3 fundamentalmente diferente. Este análisis muestra que al menos uno de los clasificadores basados en razón 3-miR es robusto y se valida incluso en la cohorte 3.

60 Sumario de la invención

65 Como el método de antígeno prostático específico (PSA) está asociado con tasas considerables de falsos negativos y no distingue bien entre tumores clínicamente inactivos o agresivos, existe la necesidad de novedosos marcadores de cáncer de próstata que puedan usarse por sí mismos o en combinación con marcadores existentes. La presente invención presenta un conjunto de marcadores y un método para aplicarlos a pacientes preseleccionados para el diagnóstico de CP.

En un primer aspecto, la invención por tanto se refiere a un método *in vitro* para evaluar el riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata, que comprende medir el nivel de expresión de al menos dos miR seleccionados del grupo de miR que consiste en: hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1238-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-22-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-99a-5p y hsa-miR-99b-5p, en una muestra de orina de dicho sujeto, en la que un nivel de expresión cambiado de dichos al menos 2 miR, en comparación con donantes sanos, indica una probabilidad aumentada de que dicho sujeto padezca cáncer de próstata.

La realización más preferida de la invención es el método *in vitro*, en el que los al menos dos miR seleccionados son hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-30c-5p. Una realización casi igualmente preferida es el método *in vitro*, en el que los al menos dos miR seleccionados son hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-30a-5p.

Un aspecto importante de la invención es aplicar el método a una población de pacientes en la que una medición convencional previa de antígeno prostático específico (PSA) ha indicado que su nivel de PSA sérico está por debajo de 10 ng/ml.

Un método diagnóstico *in vitro* que comprende calcular la puntuación de diagnóstico (S) es un aspecto útil de la invención.

En aún un aspecto, la invención se refiere a un kit para la evaluación *in vitro* del riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata, que comprende alícuotas de los reactivos necesarios para medir el nivel de expresión de al menos dos miR seleccionados del grupo de miR que consiste en: hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1238-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-22-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-99a-5p y hsa-miR-99b-5p, en una muestra de orina de dicho sujeto, en la que un nivel de expresión cambiado de dichos al menos 2 miR, en comparación con donantes sanos, indica una probabilidad aumentada de que dicho sujeto padezca cáncer de próstata.

Definiciones

Las expresiones “microARN”, “miARN” y “miR” se usan como sinónimos para referirse a un ARN no codificante de aproximadamente 18-25 nucleótidos (nt) de longitud derivado de genes endógenos. Los microARN se procesan a partir de precursores similares a horquilla más largos (aprox. 75 nt) denominados pre-miR. Los microARN se ensamblan en complejos denominados miRNP y reconocen sus dianas por complementariedad antisentido. Si los microARN coinciden con su diana al 100%, es decir la complementariedad es completa, el ARNm diana se escinde, y el miR actúa como un ARNip. Si la coincidencia es incompleta, es decir la complementariedad es parcial, entonces se bloquea la traducción del ARNm diana. En general, la denominación de miR se refiere a la nomenclatura de miRBase (versión 21), véase la tabla 11.

El término “expresión”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la transcripción y/o acumulación de moléculas de ARN dentro de una célula o en un líquido humoral libre de células.

Los términos “Q-PCR” o “q-PCR” se refieren a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. La Q-PCR es un método altamente sensible para cuantificar las cantidades de especies de ADN (y ARN) específicas en una muestra de prueba. Dado que la cuantificación de ARN mediante la técnica de PCR requiere que el ARN se someta a retrotranscripción inversa, a menudo se denomina “qRT-PCR” o “RT-Q-PCR” para indicar que se usa PCR cuantitativa para cuantificar ARN específicos. Un tratado exhaustivo de las técnicas de Q-PCR y qRT-PCR puede encontrarse en (13). En el presente contexto, “Q-PCR”, “q-PCR”, “qRT-PCR”, “QRT-PCR” o “RT-Q-PCR” pueden

usarse como sinónimos como método para cuantificar las cantidades de especies de ARN (o ADN) específicas.

En el presente contexto, los términos “nivel de expresión de un miR”, “nivel de expresión de miR” y “nivel de un miR” se usan como sinónimos como una medición de la “cantidad de un miR específico” que se detecta en la muestra. La “cantidad de un miR específico” puede expresarse en o bien mediciones absolutas, relativas o bien normalizadas y se refiere a valores obtenidos mediante tanto métodos cuantitativos así como cualitativos. Una medición particularmente preferida de la “cantidad de un miR específico” es el valor de punto de cruce (Cp) obtenido mediante RT-Q-PCR (qRT-PCR) en tiempo real tal como se describe a continuación y en los ejemplos, pero la “cantidad” también puede cuantificarse mediante PCR digital o diversos métodos de secuenciación de próxima generación. En determinadas situaciones, por ejemplo cuando las razones de niveles de expresión de miR se usan para calcular una puntuación de diagnóstico, los niveles de expresión determinados absolutos de los miR son suficientes. Sin embargo, como alternativa para realizar determinaciones basándose en el nivel de expresión absoluto de los miR, las determinaciones pueden basarse en los niveles de expresión normalizados de los miR.

Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un miR comparando su expresión con la expresión de un gen que se expresa de manera constitutiva o casi constitutiva. Los genes adecuados usados a menudo para la normalización incluyen genes de mantenimiento tales como el gen de la actina. En el presente estudio se usa una colección de miR para normalizar. Normalmente, puede usarse una colección de 3 ó 5 miARN para calcular un valor de normalización medio. El normalizador de 3 miR preferido es: hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-27b-3p y hsa-miR-30b-5p (véase el ejemplo 8). El normalizador de 5 miR preferido es: hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-27b-3p y hsa-miR-23b-3p (véase el ejemplo 5).

La “curva ROC” es la forma abreviada para la curva característica operativa del receptor. Las curvas (ROC) se usan ampliamente para comparar pruebas de diagnóstico.

Las expresiones “individuo sano”, “donante sano” y “control sano” se usan como sinónimos para referirse a individuos aparentemente sanos sin indicación manifiesta de cáncer de próstata para diferenciarlos de pacientes con cáncer de próstata.

30 Especímenes

Se recogieron las muestras en el Departamento de Urología, Hospital de la Universidad de Aarhus, Dinamarca (del 1997-2005) o en el Departamento de Oncología, The Medical School, Sheffield, Reino Unido.

El término “robustez” en relación con el clasificador de miR se usa en el presente documento para describir un clasificador que proporciona un resultado relativamente similar con respecto a la diferenciación entre pacientes con CP y sin CP aunque de alguna manera se usan metodologías de muestreo y cuantificación diferentes.

“UniRT” es un método de Q-PCR comercializado por Exiqon A/S. El método y sus características de funcionamiento se describen en los ejemplos 1 y 7, y en la solicitud de patente danesa PA 2009 00156, el documento EP2391736 y Mestdagh *et al.* Nat Methods. Agosto de 2014;11 (8):809-15.

En el presente contexto, el “valor de punto de corte” es un valor umbral por encima (o por debajo) de un valor, calculado para representar el nivel de un número de miR, que indica que una muestra celular de prueba es de un cáncer de colon.

Las realizaciones de la presente invención se describen a continuación, sólo por medio de ejemplos.

50 **Divulgación detallada de la invención**

El problema técnico subyacente a la invención es la provisión de un método *in vitro* mejorado para evaluar el riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata. En particular, se buscó un método que se basara en procedimientos no invasivos y, en consecuencia, útil para fines de cribado con la esperanza de que pueda complementar la prueba de PSA generalizada.

Tanto en la cohorte de descubrimiento (véase el ejemplo 2), en la cohorte de validación (ejemplo 3) y en el análisis alternativo presentado en los ejemplos 5 y 8, se ha observado de manera sistemática que el nivel de expresión de un grupo de miR en una muestra de orina de un paciente puede usarse como clasificador de diagnóstico de cáncer de próstata (CP). De manera colectiva, el grupo de miR consiste en 76 miR, véase la tabla 1.

60 Tabla 1

Todos los miR	A	B	C	D	E	F	G	H
hsa-let-7a-5p	X	X	X	X			X	X

ES 2 749 651 T3

hsa-let-7b-5p						X		X
hsa-let-7c-5p						X		
hsa-let-7e-5p	X	X	X	X				
hsa-let-7f-5p							X	X
hsa-let-7g-5p							X	X
hsa-miR-100-5p						X		
hsa-miR-106a-5p						X		
hsa-miR-10a-5p						X		
hsa-miR-10b-5p	X	X	X	X		X		X
hsa-miR-1238-3p	X	X	X	X				
hsa-miR-125b-5p						X		X
hsa-miR-1260a							X	X
hsa-miR-130a-3p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-132-3p						X		
hsa-miR-135a-5p						X		
hsa-miR-135b-5p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-136-5p	X	X	X	X				
hsa-miR-140-3p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-141-3p	X	X	X	X	X	X		X
hsa-miR-142-3p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-146a-5p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-148a-3p						X		
hsa-miR-151a-3p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-151a-5p						X		
hsa-miR-15b-5p						X		
hsa-miR-16-5p	X	X	X	X	X	X		X
hsa-miR-191-5p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-1972						X		
hsa-miR-19a-3p	X	X	X	X				
hsa-miR-19b-3p							X	X
hsa-miR-200a-3p						X		
hsa-miR-200b-3p	X	X	X	X		X	X	X
hsa-miR-200b-5p						X		
hsa-miR-200c-3p	X	X	X	X		X		X
hsa-miR-203a	X	X	X	X		X		
hsa-miR-204-5p	X	X	X	X		X		X
hsa-miR-205-5p	X	X	X	X	X	X		
hsa-miR-20a-5p	X	X	X	X			X	
hsa-miR-210						X		
hsa-miR-222-3p	X	X	X	X	X	X		
hsa-miR-223-3p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-22-5p	X	X	X	X				
hsa-miR-23a-3p	X	X	X	X				

ES 2 749 651 T3

hsa-miR-23b-3p	X	X	X	X		X	X	X
hsa-miR-24-3p	X	X	X	X	X	X		X
hsa-miR-25-3p						X		
hsa-miR-26a-5p							X	X
hsa-miR-27b-3p	X	X	X	X			X	X
hsa-miR-29a-3p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-29b-3p						X		
hsa-miR-29c-3p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-30a-3p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-30a-5p	X	X	X	X		X		X
hsa-miR-30b-5p	X	X	X	X		X	X	X
hsa-miR-30c-5p	X	X	X	X		X		X
hsa-miR-30e-5p	X	X	X	X				
hsa-miR-31-3p	X	X	X	X	X	X		
hsa-miR-31-5p	X	X	X	X	X	X		
hsa-miR-320a	X	X	X	X		X		
hsa-miR-320b						X		
hsa-miR-320c						X		
hsa-miR-331-3p					X	X		
hsa-miR-362-3p						X		
hsa-miR-362-5p	X	X	X	X				
hsa-miR-363-3p						X		
hsa-miR-375					X	X		
hsa-miR-378a-3p	X	X	X	X	X	X		
hsa-miR-425-3p						X		
hsa-miR-425-5p						X		
hsa-miR-455-3p	X	X	X	X				
hsa-miR-490-3p						X		
hsa-miR-660-5p						X		
hsa-miR-93-5p	X	X	X	X		X		
hsa-miR-99a-5p	X	X	X	X		X		X
hsa-miR-99b-5p							X	X

Notas X: se menciona el miR específico

A: ejemplo 2 (descubrimiento), 20 primeros significativamente regulados

B: ejemplo 3 (validación), 20 primeros significativamente regulados

C: ejemplo 5 (descubrimiento alternativo), 20 primeros significativamente regulados (tab. 5)

D: ejemplo 5 (descubrimiento alternativo)

E: ejemplo 8 (descubrimiento usando regresión LASSO), 10 mejores

F: ejemplo 5 (significativamente desregulados = tab. 6)

G: normalizadores en 23 ensayos (ejemplo 2)

H: 23 ensayos (ejemplo 2)

Sorprendentemente, se encontró que tan solo 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o incluso 2 miR extraídos de este grupo de 76 miR pueden usarse para distinguir entre pacientes con CP y pacientes con HPB con una precisión de diagnóstico, que va mucho más allá de lo que ofrece la prueba de PSA convencional, véanse los ejemplos 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

En general, el área bajo la curva (AUC) de una curva ROC es indicativo del “poder” diagnóstico de una prueba de diagnóstico. T.G. Tape ha proporcionado una puntuación para pruebas de diagnóstico, en la que

AUC: 0,90-1 = excelente

AUC: 0,80-0,90 = buena

AUC: 0,70-0,80 = razonable

AUC: 0,60-0,70 = mala

AUC: 0,50-0,60 = suspensa

(ref.: Tape, Thomas G.: “Interpreting Diagnostic Tests”, <http://gim.unmc.edu/dxtests/Default.htm>)

Según esta puntuación, los clasificadores de diagnóstico (o paneles) de la invención son de buenos a excelentes.

Por tanto, un aspecto de la presente invención es un método *in vitro* para evaluar el riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata, que comprende medir el nivel de expresión de al menos dos miR seleccionados del grupo de miR que consiste en: hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1238-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-22-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-99a-5p y hsa-miR-99b-5p, en una muestra de orina de dicho sujeto, en la que un nivel de expresión cambiado de dichos al menos 2 miR, en comparación con donantes sanos, indica una probabilidad aumentada de que dicho sujeto padezca cáncer de próstata.

Los 20 miARN más significativamente regulados en el estudio de validación parecen especialmente atractivos (tabla 20). Por tanto, una realización de la presente invención es un método *in vitro* para evaluar el riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata, que comprende medir el nivel de expresión de al menos dos miR seleccionados del grupo de miR que consiste en hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a., hsa-miR-93-5p y hsa-miR-99a-5p, en una muestra de orina de dicho sujeto, en la que un nivel de expresión cambiado de dichos al menos 2 miR, en comparación con donantes sanos, indica una probabilidad aumentada de que dicho sujeto padezca cáncer de próstata.

La medición de 76 o incluso 20 miR puede parecer poco práctica para las pruebas de diagnóstico destinadas a consultas diarias. En la tabla 3 del ejemplo 3, se muestran los miARN con el potencial de diagnóstico más fuerte para la discriminación entre controles con cáncer y sin CP. Por consiguiente, una realización adicional de la invención es un método *in vitro* para la discriminación entre CP y no CP que comprende medir el nivel de expresión de al menos dos miR seleccionados del grupo de miR que consiste en hsa-miR-141-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p y hsa-miR-31-5p.

Del mismo modo, se contempla en una realización de la invención un método *in vitro* en el que los al menos dos miR se seleccionan de un grupo de miR que consiste en los seis miR mejor clasificados, es decir hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-30c-5p y hsa-miR-31-5p.

Pueden extraerse otros grupos de miR de la tabla 3, por ejemplo el grupo de 4 miR que consiste en hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-24-3p y hsa-miR-30c-5p, que son los 4 miR con el AUC más alto en la cohorte 1, el

grupo de 3 miR que consiste en hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-24-3p y el grupo de 3 miR que consiste en hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-24-3p.

5 Un análisis adicional mostró que 5 y 4 miR extraídos también del grupo de miR dan como resultado clasificadores con un poder de diagnóstico (AUC de una curva ROC) similar a, o mejor que, el de la prueba de antígeno prostático específico total (tPSA) convencional.

10 Por consiguiente, se proporciona un método *in vitro* para evaluar el riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata, que comprende medir el nivel de expresión de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más, 10 o más o 20 miR seleccionados del grupo de miR que consiste en: hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1238-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-22-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-99a-5p y hsa-miR-99b-5p, en una muestra de orina de dicho sujeto.

25 En realizaciones adicionales de la invención, dichos al menos 2, 3, 4, 5 o más, 10 o más o 20 miR se seleccionan del grupo de miR que consiste en: hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-93-5p y hsa-miR-99a-5p, o del grupo de miR que consiste en: hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-93-5p y hsa-miR-99a-5p.

35 Para la sorpresa de los inventores, dos de los mejores clasificadores sólo comprenden tres miR seleccionados, a saber 1) hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-24-3p, y 2) hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-24-3p (véanse los ejemplos 11, 12 y 13), convirtiendo en realizaciones preferidas de la invención a estas dos firmas.

40 Parece ventajoso incluso un clasificador que comprende sólo dos miR seleccionados, a saber hsa-miR-30c-5p y hsa-miR-31-5p (véanse los ejemplos 2, 3 y 4). Además de su capacidad para discriminar entre CP y controles con especificidad y sensibilidad muy altas, este clasificador parece extraordinariamente robusto y no depende del método particular para el muestreo y la detección de niveles de miR, véase el ejemplo 4.

45 En el presente contexto, los términos “nivel de expresión de un miR”, “nivel de expresión de miR” y “nivel de un miR” se usan como sinónimos como una medición de la “cantidad de un miR específico” que se detecta en la muestra. La “cantidad de un miR específico” puede expresarse en o bien mediciones absolutas, relativas o bien normalizadas y se refiere a valores obtenidos mediante tanto métodos cuantitativos así como cualitativos. Sin embargo, como una alternativa para realizar determinaciones basándose en el nivel de expresión absoluto de los miR, las determinaciones pueden basarse en los niveles de expresión normalizados de los miR. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un miR comparando su expresión con la expresión de un gen que se expresa de manera constitutiva o casi constitutiva. Los genes adecuados usados a menudo para la normalización incluyen genes de mantenimiento tales como el gen de la actina. Por consiguiente, en una realización de la invención, los niveles de expresión son niveles de expresión normalizados. En el presente estudio, se usa una colección de miR para normalizar. Preferiblemente, se usan los 3 mejores o 5 mejores miARN más estables de Normfinder para calcular un valor de normalización medio para cada muestra. Por tanto, la normalización se realiza calculando un valor de normalización medio de 3 miR que son: hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-27b-3p y hsa-miR-30b-5p o de 5 miR que son: hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-23b-3p. Se prefiere el normalizador de 3 miR.

60 Una de las razones por las que la prueba de antígeno prostático específico total (tPSA) convencional se usa tan ampliamente para fines de cribado es que se basa en procedimientos mínimamente invasivos (análisis de sangre).

65 Aunque la tPSA sólo requiere análisis de sangre, no obstante exige que la persona sometida a prueba visite un hospital, una clínica o a un profesional de la salud que pueda tomar la muestra de sangre. En comparación, las pruebas de orina parecen ventajosas. Sin embargo, la orina contiene sólo cantidades minúsculas de miR. En la presente invención, esta dificultad se superó 1) midiendo el nivel de expresión de dichos miR en una preparación de

exosoma, preparada a partir de una muestra de orina y 2) midiendo el nivel de expresión de miR mediante el método de Q-PCR sensible a Exiqons - el método UniRT, véanse los ejemplos 1 y 7. Por consiguiente, el método UniRT es un método de Q-PCR preferido.

5 Mientras que se prefieren las muestras de orina convencionales desde un punto de vista de cribado, la bibliografía proporciona ejemplos de que pueden ser ventajosas muestras de orina obtenidas después de masaje prostático, véase por ejemplo (19). El ejemplo 4 se realiza en muestras de orina obtenidas después de masaje prostático. En el ejemplo 4 se muestra que el clasificador de 2-miR (miR-30c, miR-31-5p) posee un poder de diagnóstico que sobrepasa de lejos el poder de diagnóstico de la prueba de antígeno prostático específico total (tPSA) convencional.
10 El clasificador de 2-miR funcionó sorprendentemente bien, con un área (AUC) bajo la curva ROC de 0,79 (IC: de 0,69 a 0,90, $p < 0,0001$) y una sensibilidad del 72,9% y una especificidad del 84,8%, usando el valor umbral establecido en la cohorte 1.

15 Por consiguiente, en una realización de la invención, la muestra de orina es de un sujeto que se ha sometido a masaje prostático inmediatamente antes de que se tomara la muestra de orina.

20 Cuando se aplica un ensayo de diagnóstico en la práctica, es ventajoso usar los valores del ensayo para calcular una puntuación de diagnóstico (S) que permita definir los valores umbrales y diferenciar entre muestras cancerosas y no cancerosas basándose en la puntuación de diagnóstico. Por tanto, una realización de la presente invención es un método, en el que la evaluación del riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata implica detectar el nivel de dichos al menos dos miR en dicha muestra y calcular una puntuación de diagnóstico (S) basándose en un conjunto de datos que comprende los datos del nivel de expresión de dichos al menos dos miR.

25 El nivel de miR puede cuantificarse convenientemente mediante el método cuantitativo en tiempo real de reacción en cadena de la polimerasa mediada por la transcriptasa inversa, RT-QPCR (13).

30 Una medición particularmente preferida de la "cantidad de un miR específico" es el valor de punto de corte (Cp) obtenido mediante qRT-PCR en tiempo real. Otra medición preferida de la "cantidad de un miR específico" es el valor del "valor de umbral de ciclo (Ct)" obtenido del mismo modo mediante qRT-PCR en tiempo real tal como se describe en los ejemplos. Las mediciones de Cp y Ct de la "cantidad de un miR específico" proporcionan mediciones aproximadamente similares, véase (13). La elección de Cp o Ct depende en gran medida de la máquina a la que se vinculó y en la que se realizó el ensayo. Si la amplificación se realiza en un sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 480 usando el software Roche LC, la cantidad de un miR específico se expresa mediante el Cp. Si la amplificación se realiza en un instrumento de 384 pocillos Applied Biosystems ABI Prism 7900HT usando el software proporcionado con el mismo, la cantidad de un miR específico se expresa mediante el Ct. Lo siguiente se refiere al valor de Cp pero también se aplica al valor de Ct y al valor de "ciclo de cuantificación" (Cq).

El valor de Cp se refiere al nivel de por ejemplo un miR específico, mediante la relación:

40
$$\text{nivel de expresión (lineal) de miRx} \sim 2^{-Cp(miRx)}$$

en la que $Cp(miRx)$ designa la lectura de Cp del instrumento de QPCR en tiempo real, detectando específicamente un miR específico denominado miRx. El ejemplo 2 describe un ensayo de este tipo en detalle.

45 Por consiguiente, cuando se usan los valores de Cp como cuantificadores de niveles de miR, por ejemplo la expresión:

$$\frac{(\text{nivel de miR31}) \times (\text{nivel de miR146}) \times (\text{nivel de miR24})}{(\text{nivel de miR30c})}$$

50 es equivalente a:

$$+Cp(miR31) + Cp(miR146) + Cp(miR24) - Cp(miR30c)$$

y del mismo modo, la expresión:

55
$$\frac{(\text{nivel de miR31})}{(\text{nivel de miR30c})}$$

es equivalente a:

60
$$+Cp(miR31) - Cp(miR30c)$$

Por consiguiente, un estimador utilizable - puntuación de diagnóstico (S) - para el clasificador de 4-miR (hsa-miR-31-

5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-30c-5p y hsa-miR-24-3p) es un modelo de regresión lineal, tal como:

$$X \times Cp(miR31) + Y \times Cp(miR146) + Z \times Cp(miR24) + W \times Cp(miR30c)$$

5 en el que los coeficientes X, Y, Z y W se determinan mediante el análisis por regresión según la configuración particular.

De manera similar, un estimador - puntuación de diagnóstico (S) - para el clasificador de 2-miR es

10
$$X \times Cp(miR31) + Y \times Cp(miR30c)$$

en el que los coeficientes X e Y se determinan mediante el análisis por regresión. Se contemplan tanto regresión lineal como de otros tipos.

15 Por tanto, en una realización de la invención, la puntuación de diagnóstico (S) se calcula tal como sigue:

$$S = X \times C(\text{hsa-miR-30c-5p}) + Y \times C(\text{hsa-miR-31-5p})$$

20 en la que "C" es el valor de umbral de ciclo (Ct) o el valor de punto de cruce (Cp), y en la que X e Y son coeficientes determinados mediante regresión lineal o de otro tipo.

Por "aprendizaje automático" se hace referencia a un procedimiento que aprovecha los algoritmos informáticos que mejoran automáticamente a través de la experiencia, en la técnica este procedimiento de mejora de los algoritmos se denomina a menudo "entrenamiento". El aprendizaje automático puede usarse para descubrir reglas generales en grandes conjuntos de datos, el aprendizaje automático puede usarse, por ejemplo, para extraer datos clínicos informativos de un conjunto de datos que comprende la expresión de miR en muestras cancerosas y no cancerosas de la próstata. Un tratado general del concepto de aprendizaje automático puede encontrarse en (21), que se incorpora en el presente documento mediante referencia. Por consiguiente, en una realización de la invención, el algoritmo para calcular la puntuación de diagnóstico (S) se alcanzó aplicando aprendizaje automático.

30 Sorprendentemente, tal como se muestra en los ejemplos, incluso estimadores simples basados en razones tales como:

35
$$S = \frac{(\text{nivel de miR24} - 3p)(\text{nivel de miR222} - 3p)}{(\text{nivel de miR30c} - 5p)^2}$$

$$S = \frac{(\text{nivel de miR24} - 3p)(\text{nivel de miR222} - 3p)}{(\text{nivel de miR30a} - 5p)^2}$$

o:

40
$$S = \frac{(\text{nivel de miR31})}{(\text{nivel de miR30c})}$$

45 tienen una característica de diagnóstico que sobrepasa de lejos el poder de diagnóstico de la prueba de antígeno prostático específico total (tPSA) convencional, y además tiene la ventaja de hacer innecesaria la normalización, simplificándose así el ensayo adicionalmente.

Por consiguiente, realizaciones favorables de la invención son métodos que comprenden que la puntuación de diagnóstico S se calcule como una razón del nivel de expresión de miR, por ejemplo la razón del nivel de expresión de hsa-miR-24-3p y hsa-miR-222-3p frente al nivel de expresión de hsa-miR-30a-5p, la razón del nivel de expresión de hsa-miR-24-3p y hsa-miR-222-3p frente al nivel de expresión de hsa-miR-30c-5p, o la razón del nivel de expresión de hsa-miR-30c-5p frente al nivel de expresión de hsa-miR-31-5p.

55 Tal como se comentó, la razón entre hsa-miR-31-5p y hsa-miR-30c-5p se realiza sorprendentemente bien con un AUC del 89,9% en la cohorte de descubrimiento (ejemplo 5). Tal como se ilustra en los ejemplos 11, 12 y 13, los dos clasificadores basados en razón de tres-miR: hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p sobre hsa-miR-30a-5p, y hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p sobre hsa-miR-30c-5p, tuvieron un rendimiento incluso mejor, mostrando AUC en las validaciones próximos a o incluso por encima de 0,9.

Por consiguiente, en realizaciones adicionales de la invención, la puntuación de diagnóstico (S) se calcula como:

60
$$S = C(\text{hsa-miR-24-3p}) + C(\text{hsa-miR-222-3p}) - (2 \times C(\text{hsa-miR-30a-5p}))$$

en la que "C" es el valor de umbral de ciclo (Ct) o el valor de punto de cruce (Cp) obtenido mediante PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) para hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-30a-5p, respectivamente, o como:

$$S = C(\text{hsa-miR-24-3p}) + C(\text{hsa-miR-222-3p}) - (2 \times C(\text{hsa-miR-30c-5p}))$$

en la que "C" es el valor de umbral de ciclo (Ct) o el valor de punto de cruce (Cp) obtenido mediante PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) para hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-30c-5p, respectivamente.

10 No obstante, en el ejemplo 5 se mencionan otras varias razones de 2-miR que funcionan sorprendentemente bien, véase la tabla 7 del ejemplo 5. Además, estos biomarcadores basados en razón se consideran como realizaciones de la invención.

15 Una realización particularmente interesante de la invención se refiere al grupo de pacientes caracterizado porque una medición convencional previa de antígeno prostático específico (PSA) ha indicado que su nivel de PSA sérico está por debajo de 10 ng/ml.

20 Este grupo es quizás el más interesante porque sus pruebas de PSA los colocan en una "zona gris" con respecto a las pruebas invasivas adicionales. Por consiguiente, estos pacientes se beneficiarían enormemente de una prueba que puede complementar la prueba de PSA.

Sorprendentemente, los dos clasificadores de tres-miR fueron incluso más exitosos cuando se validaron en la subpoblación de pacientes con niveles de PSA por debajo de 10 ng/ml (ejemplo 10).

25 En particular, los clasificadores hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-24-3p son notables con un AUC = 0,91 cuando se realiza la cohorte de validación (véase el ejemplo 13).

30 Por tanto, el clasificador hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-24-3p con la puntuación de diagnóstico (S) = $C(\text{hsa-miR-24-3p}) + C(\text{hsa-miR-222-3p}) - (2 \times C(\text{hsa-miR-30c-5p}))$, en la que "C" es el valor de umbral de ciclo (Ct) o el valor de punto de cruce (Cp) obtenido mediante PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) específico para el miR, es la realización preferida de la invención.

35 Además, el clasificador hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-24-3p demuestra ser notablemente robusto. Para investigar la robustez del clasificador de tres-miR, se aplicó el ensayo a una cohorte independiente (cohorte 3) en la que los especímenes se muestrearon y procesaron con una metodología considerablemente diferente que la de las cohortes 5 y 6 (ejemplo 14). De manera interesante, los clasificadores hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-24-3p también se validaron con éxito en esta cohorte (ejemplo 14).

40 En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar un paciente que necesita un tratamiento de cáncer de próstata, comprendiendo el método: realizar una prueba de diagnóstico según cualquiera de los elementos precedentes para determinar si el paciente tiene una probabilidad aumentada de que padezca cáncer de próstata, y seleccionar una terapia apropiada para el paciente basándose en esta información.

45 Un aspecto adicional de la invención es un kit de partes para la evaluación *in vitro* del riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata, que comprende alícuotas de los reactivos necesarios para medir el nivel de expresión de al menos dos miR seleccionados del grupo de miR que consiste en: hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1238-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-22-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-99a-5p y hsa-miR-99b-5p, en una muestra de orina de dicho sujeto, en la que un nivel de expresión cambiado de dichos al menos 2 miR, en comparación con donantes sanos, indica una probabilidad aumentada de que dicho sujeto padezca cáncer de

60 próstata.

65 Realizaciones adicionales de la invención son un kit, en el que los al menos dos miR se seleccionan del grupo de miR que consiste en: hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a., hsa-miR-93-5p y hsa-miR-99a-5p, o

en el que los al menos dos miR se seleccionan del grupo de miR que consiste en: hsa-miR-141-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p y hsa-miR-31-5p, o

5 en el que los al menos dos miR se seleccionan del grupo de miR que consiste en: hsa-miR-141-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p y hsa-miR-331-3p, o

10 en el que los al menos dos miR se seleccionan del grupo de miR que consiste en: hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-30c-5p y hsa-miR-31-5p.

En particular, se prefiere un kit en el que los al menos dos miR seleccionados son: hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-24-3p.

15 Probablemente debido a las ARNasas, la abundancia de microARN libres (es decir, no en células o partículas) en líquidos orgánicos tales como muestras de orina convencionales es muy baja. Sin embargo, se ha demostrado que los microARN están estabilizados y protegidos de la degradación de la ARNasa mediante la inclusión en diversos complejos de proteínas y partículas membranosas tales como exosomas o microvesículas.

20 Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, los miR se extraen de una preparación de exosoma de la muestra de orina.

Y como consecuencia, un kit preferido según la invención comprende reactivos necesarios para obtener la preparación de exosoma de la muestra de orina.

25 La invención se ilustra de manera adicional en los siguientes ejemplos no limitativos y las figuras.

Leyendas

30 Figura 1: las curvas ROC para el clasificador de 2 miR que se compone de la razón de miR-31-5p frente a miR-30c. La fig. 1A es la curva ROC para la cohorte 1 (cohorte de descubrimiento), la fig. 1B es la curva ROC para la cohorte 2 (cohorte de validación, ejemplo 3) y la fig. 1C es la curva ROC para la cohorte 3 (cohorte de validación, ejemplo 4).

35 Figura 2: la curva ROC para los 20 miARN presentados en el ejemplo 5, tabla 5. La sensibilidad y la especificidad se proporcionan bajo la curva.

Figura 3: clasificador de 2 miR para el diagnóstico de CP aplicado en cáncer de vejiga frente a controles (miR31-5p - miR30c-5p).

40 Figura 4: el método UniRT.

Figura 5: curva ROC del clasificador de panel de 3 miR en las cohortes de descubrimiento y de validación (cohortes 4 y 5).

45 Figura 6: curva ROC del clasificador de panel de 7miR (hsa-miR-141-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p y hsa-miR-331-3p) en las cohortes de descubrimiento y de validación (cohortes 4 y 5).

50 Figura 7a: curva ROC del clasificador basado en razón 3miR_1 (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30a-5p) en la cohorte de descubrimiento, cohorte 4.

Figura 7b: curva ROC del clasificador basado en razón 3miR_2 (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30c-5p) en la cohorte de descubrimiento, cohorte 4.

55 Figura 8a: curva ROC del biomarcador basado en razón 3miR_1 (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30a-5p) distintivo en la cohorte de validación (cohorte 5).

Figura 8b: curva ROC del clasificador basado en razón 3miR_2 (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30c-5p) en la cohorte de validación (cohorte 5).

60 Figura 9a: curva ROC del biomarcador basado en razón 3miR_1 distintivo en un subconjunto de la cohorte de validación 5 (< 10 ng/ml).

65 Figura 9b: curva ROC del biomarcador basado en razón 3miR_2 razón distintivo en un subconjunto de la cohorte de validación (cohorte 5).

Figura 10: visión general de las cohortes “danesas”.

Figura 11: curva ROC de la validación del clasificador basado en razón 3miR_2 (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30c-5p) en la cohorte 3.

5

Ejemplo 1

Título: estudio piloto - obtención del perfil de microARN en orina libre de células fraccionada de exosoma

10 Objeto del estudio

Identificar microARN abundantes presentes en muestras de orina libres de células de individuos sanos y pacientes con cáncer de próstata (en diferentes estadios de la enfermedad).

15 Especímenes

20 Todas las muestras se recogieron en el Departamento de Urología, Hospital de la Universidad de Aarhus, Dinamarca (de 1997-2005). El conjunto de muestras consistió en duplicados de 12 muestras no malignas (NM; de pacientes con hiperplasia prostática benigna (HPB) (controles), 33 pacientes muestreados antes de someterse a una prostatectomía radical (PR) destinada de manera curativa para CP clínicamente localizado e histológicamente verificado (PR), y 8 pacientes con CP resistente a la castración (CPRC). 34 de estas muestras pertenecen a la cohorte 1 (ejemplo 2).

25 Método

Preparación de muestras

30 Se centrifugaron las muestras de orina y se transfirieron 4,5 ml de sobrenadante a un tubo CRYO de 5 ml, y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se extrajo el ARN de los exosomas de 3 ml de sobrenadante de orina usando el kit de aislamiento de ARN miRCURY™ (n.º de catálogo 300102) - aislamiento de exosomas en combinación con los kits de aislamiento de ARN miRCURY™ - Cell & Plant (n.º de catálogo 300110), ambos de Exiqon, según las instrucciones del fabricante. El ARN purificado se almacenó a -80°C hasta su uso.

Obtención del perfil de la expresión de microARN

35 La obtención del perfil se realizó usando la plataforma miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR de Exiqon en duplicados (dos reacciones de transcripción inversa separadas). Exiqon Services, Vedbaek, Dinamarca, realizó todos los experimentos de reacciones en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) y los controles de calidad de los datos. De manera breve, se sometieron a transcripción inversa (RT) 2 µl de ARN en reacciones de 10 µl usando el kit II de síntesis de ADNc universal miRCURY LNA™ microRNA PCR (n.º de catálogo 203301). El ADNc se diluyó 100x y se usaron 2 µl como entrada para reacciones PCR de 10 µl. Se analizaron los niveles de microARN relativos usando PCR lista para usar de microARN, panel I+II humano, V3.R, en placas de PCR de 384 pocillos, n.º de catálogo. 203611/203612), sometiendo a ensayo 752 microARN diferentes. Obsérvese que lo que se denominaba previamente “hsa-miR-210” en relación con la nomenclatura de miRBase (versión 19), debe denominarse “hsa-miR-210-3p” para tenerse en cuenta la nomenclatura de miRBase (versión 21). El mismo problema se aplica a “hsa-let-7c” y “hsa-let-7c-5p”; y hsa-miR-203a y hsa-miR-203a-3p. En la tabla 11 se presenta una visión general de los miR de la presente invención, sus nombres y su secuencia. Para todos los análisis, se usó ExiLENT SYBR® Green master mix (n.º de catálogo 203421). Se realizaron los controles negativos que excluían el molde de ARN de la reacción de transcripción inversa y se caracterizaron en paralelo. La amplificación se realizó en un sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 480 (Roche). Las curvas de amplificación se analizaron usando el software Roche LC, tanto para la determinación del valor de ciclo de cuantificación (Cp) como para el análisis de la curva de fusión.

Resultado:

55 Todos los ensayos para los que los valores de Cp promedio estaban por debajo de 36 y se detectaron en al menos 2 muestras se incluyeron para un análisis adicional. Se seleccionaron 183 microARN para el estudio de descubrimiento (ejemplo 2).

60 **Ejemplo 2**

Título: identificación de clasificador de diagnóstico que discrimina entre controles sanos y casos de CP

Objeto

65 Identificar microARN con potencial de biomarcador de diagnóstico en muestras de orina de pacientes con cáncer de

próstata (CP) y controles sanos.

Especímenes

- 5 Todas las muestras de orina se recogieron en el Departamento de Urología, Hospital de la Universidad de Aarhus, Dinamarca (de 1997-2005). La cohorte de entrenamiento (cohorte 1) consistió en 8 muestras no malignas (NM; de pacientes con HPB (controles), 122 muestras de pacientes que se habían sometido a RP destinada de manera curativa de CP clínicamente localizado e histológicamente verificado, 5 de cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC). Véase la tabla 2 para una visión general de la composición de las muestras de las cohortes.

10

Tabla 2: composición de pacientes de las cohortes 1 y 2

	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte de descubrimiento combinada (1+2)
HPB	8	47	48
CPRC	5	3	5
PR	122	98	205
PR+después del final	1	0	1

Método

15

Preparación de muestras

Se centrifugaron las muestras de orina y se transfirieron 4,5 ml de sobrenadante a un tubo CRYO de 5 ml, y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se extrajo el ARN de los exosomas de 3 ml de sobrenadante de orina usando el kit de aislamiento de ARN miRCURY™ (n.º de catálogo 300102) - aislamiento de exosomas en combinación con los kits de aislamiento de ARN miRCURY™ - Cell & Plant (n.º de catálogo 300110), ambos de Exiqon, según las instrucciones del fabricante. El ARN purificado se almacenó a -80°C hasta su uso.

20

Obtención del perfil de la expresión de microARN

25

La obtención del perfil se realizó en singlete usando la plataforma miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR de Exiqon. Exiqon Services, Vedbaek, Dinamarca, realizó todos los experimentos de reacciones en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) y los controles de calidad de los datos. De manera breve, se sometieron a transcripción inversa (RT) 2 µl de ARN en reacciones de 10 µl usando el kit II de síntesis de ADNc universal miRCURY LNA™ microRNA PCR (n.º de catálogo 203301). El ADNc se diluyó 100x y se analizaron 2 µl en reacciones de PCR de 10 µl. Para la cohorte 1, se analizaron los niveles de microARN relativos usando PCR lista para usar de microARN, un panel de PCR de microARN Pick-&Mix (hecho a medida; artículo n.º 20381) que consistió en los 183 ensayos de microARN seleccionados (ejemplo 1) y 4 controles de adiciones conocidas, 384 pocillos. Para todos los análisis, se usó ExiLENT SYBR® Green master mix (n.º de catálogo 203421). Se realizaron los controles negativos que excluían el molde de ARN de la reacción de transcripción inversa y se obtuvieron los perfiles en paralelo. La amplificación se realizó en un sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 480 (Roche). Las curvas de amplificación se analizaron usando el software Roche LC, tanto para la determinación del valor de ciclo de cuantificación (Cp) como para el análisis de la curva de fusión. Los microARN para los que todos los valores de Cp excedieron 37 en todas las muestras se excluyeron del análisis adicional. Para excluir cualquier muestra de baja calidad, se retiró cualquier muestra con un número detectado de miARN por debajo de 100.

30

35

40

Filtrado de datos y normalización de datos

Se calculó la eficacia de la amplificación usando algoritmos similares al software LinReg. Se inspeccionaron todos los ensayos para las distintas curvas de fusión y se comprobó la Tf para que estuviera dentro de las especificaciones conocidas para el ensayo. Además, los ensayos deben detectarse con 3 Cp menos que los del control negativo, y con Cp<37 para incluirse en el análisis de datos. Los datos que no pasaron estos criterios se omitieron de cualquier análisis adicional. El Cp se calculó como la 2ª derivada. Para excluir cualquier muestra de baja calidad, se retiró cualquier muestra con un número detectado de miARN por debajo de 100. Usando NormFinder, se encontró que el mejor normalizador era el promedio de ensayos detectados en todas las muestras. Todos los datos se normalizaron al promedio de ensayos detectados en todas las muestras (N=23) (promedio - ensayo Cp), un método robusto que se muestra como la mejor normalización para estudios de qRT-PCR que implican numerosos ensayos (13). Los 23 ensayos son:

50

55 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-99a-5p y hsa-miR-99b-5p.

Análisis estadístico

5 Análisis de expresión: para todos los análisis, valores $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se usó la prueba Shapiro Wilk para evaluar si los datos se distribuían de manera normal. Como varios de los microARN no lo hacían, se usó una prueba estadística no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon para las comparaciones por emparejamiento de expresión de microARN entre los diferentes grupos. El potencial de diagnóstico de la expresión de miARN se evaluó mediante el análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC).

10

Resultados

Datos de expresión:

15 Se encontró que varios microARN estaban significativamente regulados ($P < 0,01$) basándose en la prueba de rangos de Wilcoxon, siendo los 20 mejores: hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-5p y hsa-miR-362-5p.

20

Rendimiento de diagnóstico de la expresión de microARN y desarrollo de un clasificador de microARN de diagnóstico

25 El potencial de diagnóstico de un miARN puede evaluarse mediante la curva característica operativa del receptor (ROC), usando el área bajo la curva (AUC) como una medición del rendimiento. A este respecto, el miARN-31-5p muestra el potencial más alto, teniendo un AUC de 0,92 en la cohorte de descubrimiento.

30 Para aumentar la diferencia de detección y eludir la necesidad de normalización, aumentándose así la robustez del ensayo, se calculó la razón de los miARN regulados por incremento más significativamente frente a los miARN regulados por disminución más robustamente significativos. Se encontró que la razón entre miARN-31-5p y miR-30c ofrecía un mayor valor de AUC que el miARN-31-5p por sí mismo (tabla 3).

Conclusión

35 A pesar de la distribución desigual de las categorías con sólo 8 controles (HPB) frente a los 122 casos (PR), se pudo identificar la razón de miR-31-5p frente a miR-30c como un potente clasificador de 2 miR con una excelente precisión de diagnóstico, tal como se determinó mediante el área bajo la curva (AUC) ROC (AUC=0,92), con una especificidad del 85,7% y una sensibilidad del 92,2%.

Ejemplo 3

Título: validación del rendimiento de diagnóstico del clasificador de 2 miR (Cp(miR- 31-5p) - Cp(miR-30c))

Objeto

45 Verificar el patrón de expresión de miARN de muestras de orina de pacientes con CP en comparación con muestras de controles y validar el clasificador de 2 miR (Cp(miR- 31-5p) - Cp(miR-30c)) identificado en el ejemplo 2.

Especímenes (cohorte 2)

50 Todas las muestras de orina se recogieron en el Departamento de Urología y se obtuvieron del Instituto de Patología, Hospital de la Universidad de Aarhus, Dinamarca (de 1997-2005). Para todos los individuos, un patólogo cualificado evaluó secciones de especímenes de tejido embebido en parafina fijadas en formalina teñidas con H&E. La cohorte de validación (cohorte 2) consistió en 47 muestras no malignas (controles: pacientes con HPB), 98 muestras de pacientes que se someten a PR destinada de manera curativa de CP clínicamente localizado e histológicamente verificado (PR) y 3 de cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC). Véase la tabla 2 para una visión general de la composición de las muestras de las cohortes.

Método

60

Preparación de muestras

Como el ejemplo 1.

65

Obtención del perfil de la expresión de microARN

La obtención del perfil se realizó exactamente como en el ejemplo 2.

Filtrado de datos y normalización de datos

5 El filtrado y la normalización de datos se realizaron exactamente como en el ejemplo 2. Todos los datos se normalizaron al promedio de ensayos detectados en todas las muestras (N=23) (promedio - ensayo Cp), un método robusto que se muestra como la mejor normalización para estudios de qRT-PCR que implican numerosos ensayos (14).

10 *Análisis estadístico*

Análisis de expresión: para todos los análisis, valores P < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Se usó la prueba Shapiro Wilk para evaluar si los datos se distribuían de manera normal. Como varios de los microARN no lo hacían, se usó una prueba estadística no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon para las comparaciones por emparejamiento de expresión de microARN entre los diferentes grupos. Se corrigieron los valores P fueron corregidos para múltiples pruebas usando el método de Benjamini-Hochberg (15). El potencial de diagnóstico de la expresión de miARN se evaluó mediante el análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC).

20 Resultados

Se encontró que varios microARN estaban significativamente regulados (P<0,01) basándose en la prueba de rangos de Wilcoxon ajustada para las pruebas múltiples (método de Benjamin Hochberg (BH)), siendo los 20 mejores: hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a., hsa-miR-93-5p y hsa-miR-99a-5p.

Entre estos 20 mejores miARN significativamente regulados, hubo una superposición de 10 miARN significativamente regulados entre las cohortes 1 y 2 (tabla 3).

30 Tal como se observa en la tabla 3, el miARN con el potencial de diagnóstico más fuerte para la discriminación entre cáncer y controles es miR-31-5p y miR-146, sin embargo miR-146 sólo se detecta en el 60% de las muestras y por tanto no es un candidato adecuado, mientras que miR-31-5p se detecta en el 96% de las muestras (AUC = 0,85).

35 Tabla 3: miARN significativamente regulado tanto en la cohorte 1 como en la 2, los miR se clasifican según el valor p basándose en la prueba de rangos de Wilcoxon en la cohorte de validación después del ajuste para las pruebas múltiples mediante el método de Benjamin Hochberg (BH).

Nombre de miARN	Cohorte 2 (validación)			Cohorte 1 (descubrimiento)		
	Cambio en veces	Valor p ajustado mediante BH	AUC (IC del 95%) (p<0,0001)	Cambio en veces	Valor p de Wilcoxon ajustado mediante BH	AUC (IC del 95%) (p>0,0001)
hsa-miR-31-5p	-2,7	1,70E-08	0,85 (de 0,77 a 0,92)	-3,5	0,001298	0,92 (de 0,83 a 1,00)
hsa-miR-146a-5p	-8,9	4,70E-08	0,86 (de 0,78 a 0,94)	-13	9,5E-05	0,95 (de 0,89 a 1,00)
hsa-miR-205-5p	-2,6	0,000015	0,78 (de 0,69 a 0,88)	-3	0,007226	0,85 (de 0,66 a 1,00)
hsa-miR-16-5p	-1,7	0,000015	0,79 (de 0,70 a 0,88)	-1,6	0,000226	0,84 (de 0,75 a 0,95)
hsa-miR-200c-3p	-1,5	0,000031	0,76 (de 0,67 a 0,85)	-1,5	0,00224	0,82 (de 0,63 a 1,00)
hsa-miR-30c-5p	1,3	0,00026	0,73 (de 0,75 a 0,81)	1,6	0,002904	0,86 (de 0,71 a 1,00)
hsa-miR-24-3p	-1,4	0,00047	0,74 (de 0,64 a 0,83)	-1,4	7,69E-05	0,86 (de 0,77 a 0,95)
hsa-miR-141-3p	-1,5	0,00051	0,78 (de 0,69 a 0,87)	-1,6	0,015074	0,83 (de 0,66 a 1,00)
hsa-miR-222-3p	-1,6	0,001	0,74 (de 0,65	-1,6	0,014024	0,79 (de 0,64

			a 0,83)			a 0,94)
hsa-miR-30a-5p	1,3	0,0013	0,71 (de 0,62 a 0,81)	1,6	0,001836	0,85 (de 0,75 a 0,96)
miR2 (miR31-5p/miR30c)	-	-	0,86 (de 0,79 a 1,00)	-	-	0,92 (de 0,80 a 1,00)
<p>“Cambio en veces” es la diferencia relativa en la expresión de miR entre controles (HPB) y casos (PR), “-” designa que el miR específico está regulado por disminución en el cáncer.</p> <p>“AUC” designa el área bajo la curva característica operativa del receptor.</p> <p>“IC del 95%” designa los intervalos de confianza (IC) del 95%.</p>						

El potencial de diagnóstico del clasificador de 2-miR (miR-31-5p/miR30c) con el corte establecido en la cohorte 1 se validó en la cohorte 2, usando análisis de ROC con una alta precisión de diagnóstico; definida por el área bajo la curva ROC de 0,86 (IC del 95%: de 0,79 a 1,00, $p < 0,0001$), se encontró una sensibilidad del 72,5% y una especificidad del 84,1%.

Conclusión:

Se validaron con éxito el potencial de diagnóstico de miR-31-5p (normalizado) y del clasificador de 2 miARN (razón) (miR-31-5p/miR-30c) en una cohorte de validación independiente usando un valor de corte similar al establecido en la cohorte 1. La precisión del clasificador de 2 miARN (miR-31-5p/miR-30c) de diagnóstico fue alta (AUC=0,86), con una sensibilidad y una especificidad del 72,5% y del 84,1%, respectivamente.

Ejemplo 4

Título: prueba de robustez de clasificador en una cohorte 3 independiente

Objeto como marcador

Para someter a prueba la robustez del clasificador de 2-miR; es decir su potencial de diagnóstico para separar muestras de manera correcta en casos y controles de cáncer, incluso en una cohorte que se muestreó y procesó según una metodología diferente considerable. Los especímenes de la cohorte 3 difirieron de las cohortes 1 y 2 con respecto a los siguientes parámetros: 1) nacionalidad (Reino Unido), 2) muestreo (muestreo antes de masaje prostático), 3) tecnología de extracción de ARN (extracción de células libres de orina completas sin enriquecimiento para exosomas - kit usado diferente). Por tanto, una superposición a los ejemplos 1 y 2 de los dos miARN que se regulan significativamente por incremento/disminución sería una prueba de la robustez.

Especímenes

Se proporcionaron las muestras de orina por el Departamento de Oncología, The Medical School, Sheffield, Reino Unido. La cohorte de validación 3 consistió en 34 muestras de control no malignas, 36 muestras de pacientes con cáncer de próstata localizado, 20 pacientes con CP avanzado. Se extrajo el ARN directamente de la fracción de orina libre de células (sobrenadante) usando el kit de aislamiento de miARN mirVana™ (número de catálogo: AM1560) de Ambion, Life Technology, según las instrucciones del fabricante. El ARN purificado se almacenó a -80°C hasta su uso.

Métodos

La obtención del perfil se realizó como en el ejemplo 3. Para la cohorte 3, se analizaron los niveles de microARN relativos usando PCR lista para usar de microARN, panel de PCR de microARN Pick-&-Mix hecho a medida que consistía en 48 ensayos de microARN seleccionados y 4 controles de adiciones conocidas. Las muestras en las que se midió menos del 50% de los 48 miARN se retiraron del conjunto de muestras. La normalización de la cohorte 3 se realizó usando el algoritmo de NormFinder (40) tanto en la cohorte 1 como en la cohorte 3, y seleccionado el miARN expresado de manera más estable tanto en los conjuntos como en el gen de normalización, hsa-miR-103a-3p.

Resultados

Los casos clasificados del clasificador de 2 miR (miR31-5p, 30c) de los controles con una sensibilidad y una especificidad del 72,9% y del 84,4%, respectivamente, usando el valor de corte establecido en la cohorte 1 y con un área bajo la curva ROC de 0,79 (IC: de 0,69 a 0,90, $p < 0,0001$), véase la tab. 4 y la fig. 1c.

Tabla 4: se trazaron las curvas operativas del receptor para el clasificador miR-31-5p/miR-30c en tres cohortes, véanse las figs. 1a, b y c, y se calculó el área bajo la curva característica operativa del receptor. Los intervalos de

confianza (IC) del 95% se indican en la tabla.

clasificador de miR	Descubrimiento (cohorte 1)		Validación (cohorte 2)		Validación (cohorte 3)	
	AUC	IC del 95% ^b	AUC	IC del 95% ^b	AUC	IC del 95% ^b
miR-31-5p/miR-30c	0,92	de 0,80 a 1,00	0,86	de 0,79 a 0,100	0,79	de 0,69 a 0,90

Conclusión

5 A pesar de que la cohorte 3 es fundamentalmente diferente de las cohortes 1 y 2, diferencia de la estrategia de recolección, procesado y normalización de especímenes, se confirmó el potencial de diagnóstico de miR31. El clasificador de 2 miR se validó con éxito en esta cohorte independiente (cohorte 3) usando el mismo valor de corte al establecido en las cohortes 1 y 2. La precisión del clasificador de diagnóstico fue alta (AUC = 0,79), con una sensibilidad del 72,9% y una especificidad del 84,8%.

Ejemplo 5

15 Título: descubrimiento mejorado de biomarcadores de miARN basados en clasificador con potencial de diagnóstico

Objeto

20 Puede ser ventajoso usar un panel de miARN, un clasificador que no aumente o disminuya el nivel de expresión de un miARN individual. Para aumentar el poder estadístico de la identificación de miARN con potencial de diagnóstico, se combinaron la cohorte 1 y la cohorte 2 en una gran cohorte de descubrimiento. El conjunto de datos combinado tiene el suficiente poder de enfoque estadístico para la construcción de clasificadores.

Especímenes (cohorte 1 y cohorte 2)

25 La cohorte combinada (cohorte 1, ejemplo 1, y cohorte 2, ejemplo 2) consistió en 48 muestras no malignas (NM; de pacientes con HPB (controles), 205 muestras de pacientes con RP destinadas de manera curativa de CP clínicamente localizado e histológicamente verificado y 8 de cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC).

Métodos

Filtrado y normalización de datos

30 Para reducir el número de normalizadores, los datos filtrados en segundo plano (en los que una medición se obtiene en todas las muestras) se analizaron para el algoritmo de Normfinder (14). Los 5 mejores miARN más estables de Normfinder (hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-23b-3p) se usaron para calcular un valor de normalización medio para cada muestra. El valor medio de normalización para cada muestra individual se sustrajo de los valores de Cp de datos sin procesar para cada muestra individual para obtener el valor de ΔC_p . Las dos estrategias de normalización (normalización de los 5 mejores miARN y media global) proporcionaron resultados muy similares en cuanto a mejores microARN expresados diferencialmente así como en la clasificación general de microARN, apoyándose así la validez de los 5 microARN como genes de normalización en un estudio de validación posterior. El método de normalización de los 5 miR se usa para todos los análisis posteriores.

Construcción de clasificadores

45 Cada clasificador de miARN se construyó mediante muestreo de Monte Carlo, extrayendo desde 2 hasta 20 miARN al azar de los 100 mejores miARN más significativos entre dos grupos (basándose en un valor p de la prueba de Wilcoxon ajustado por Benjamin-Hochberg) (17). Esto se realizó 1 millón de veces, y se sometió a prueba el rendimiento para cada clasificador, usando el AUC de la ROC o el valor p de la prueba de Mantel-Cox como la puntuación para los clasificadores de diagnóstico y pronóstico, respectivamente. Luego se redujo el clasificador mediante enfoques de clasificador de máxima verosimilitud de validación cruzada dejando uno fuera (LOOCV) para reducir el clasificador (18).

Puntuación usando el clasificador

55 Se calculó la puntuación del paciente basada en un clasificador tal como sigue: se seleccionó un valor de corte (valor de ΔC_p) para un miARN dado basándose en el mejor umbral (índice de Youden (Youden, 1950)) (17) de una curva ROC tal como se determina mediante el paquete pROC en R. Luego, se examinó el valor de ΔC_p para cada paciente para un miARN dado, y si el valor de ΔC_p del paciente era superior que el corte, el miARN recibió una puntuación de de +1, o -1 si el valor de ΔC_p era menor que el corte. Dependiendo de si el miARN estaba regulado por incremento o por disminución, los signos operacionales se cambiaron en consecuencia. Finalmente, si no se

encontró que un miARN dado se expresaba dentro de los límites de detección, se le asignó una puntuación de 0. Este procedimiento se realizó para cada miARN y los resultados se suman para dar una puntuación de clasificador total para cada paciente.

5 Resultados

Los 20 mejores miARN que se encuentran significativamente desregulados entre HPB y PR después de ajustar para múltiples pruebas mediante Benjamin Hochberg en este gran conjunto de muestras combinadas se muestran en la tabla 5, 15 de los 20 miARN que se validaron en el ejemplo 3 están todos contenidos en este conjunto. La tabla 6 muestra todos los miARN significativamente desregulados entre HPB y PR encontrados en el ejemplo 5.

Tabla 5: 20 mejores miARN con miARN significativamente regulado entre controles (HPB) y casos (PR).

nombre de miARN	Expresado	$\Delta\Delta Cq$	Veces	Prueba de Wilcoxon para BH	AUC
hsa-miR-31-5p	99	-1,77	-3,41	5,3E-14	0,89
hsa-miR-141-3p	100	-0,82	-1,76	8,3E-12	0,85
hsa-miR-146a-5p	70	-3,23	-9,40	3,8E-10	0,88
hsa-miR-222-3p	100	-0,83	-1,78	2,8E-09	0,81
hsa-miR-24-3p	100	-0,59	-1,51	1,4E-08	0,80
hsa-miR-320a	100	-0,74	-1,67	3,9E-08	0,79
hsa-miR-16-5p	100	-0,71	-1,64	1,2E-07	0,78
hsa-miR-31-3p	89	-1,20	-2,30	1,2E-07	0,79
hsa-miR-205-5p	100	-1,36	-2,58	1,4E-07	0,78
hsa-miR-200b-3p	100	-0,58	-1,49	1,4E-07	0,78
hsa-miR-200c-3p	100	-0,56	-1,47	2,3E-07	0,77
hsa-miR-203a	100	-0,89	-1,86	2,5E-07	0,77
hsa-miR-30c-5p	100	0,39	1,31	2,5E-07	0,77
hsa-miR-10b-5p	100	0,52	1,43	9,4E-07	0,76
hsa-miR-23b-3p	100	-0,27	-1,21	2,0E-06	0,75
hsa-miR-30a-5p	100	0,44	1,36	3,5E-06	0,75
hsa-miR-151a-3p	95	-0,80	-1,74	3,6E-06	0,75
hsa-miR-30b-5p	100	0,25	1,19	6,5E-06	0,74
hsa-miR-378a-3p	96	-0,80	-1,75	2,2E-05	0,73
hsa-miR-191-5p	100	-	-1,45	5,5E-05	0,72

“ $\Delta\Delta Cq$ ” es una medición de la diferencia relativa en la expresión génica entre controles (HPB) y casos (PR) determinada mediante el método $2-\Delta\Delta Ct$, véase (20).

“Veces” es la diferencia relativa en la expresión génica entre controles (HPB) y casos (PR), “-” designa que el miR está regulado por disminución en el cáncer.

“Expresado” indica el porcentaje de muestras que expresan cantidades medibles del miR.

15 Tabla 6: miARN significativamente desregulados entre HPB y PR. Los miR se clasifican según el producto de AUC y expresión.

nombre de miARN	Expresado	$\Delta\Delta Cp$	Veces	Prueba de Wilcoxon ajustada para BH	AUC	Ej*AUC
hsa-miR-31-5p	99	-1,77	-3,41	5,30E-14	0,89	88,11
hsa-miR-141-3p	100	-0,82	-1,76	8,30E-12	0,85	85
hsa-miR-222-3p	100	-0,83	-1,78	2,80E-09	0,81	81
hsa-miR-24-3p	100	-0,59	-1,51	1,40E-08	0,8	80

ES 2 749 651 T3

hsa-miR-320a	100	-0,74	-1,67	3,90E-08	0,79	79
hsa-miR-16-5p	100	-0,71	-1,64	1,20E-07	0,78	78
hsa-miR-205-5p	100	-1,36	-2,58	1,40E-07	0,78	78
hsa-miR-200b-3p	100	-0,58	-1,49	1,40E-07	0,78	78
hsa-miR-200c-3p	100	-0,56	-1,47	2,30E-07	0,77	77
hsa-miR-203a	100	-0,89	-1,86	2,50E-07	0,77	77
hsa-miR-30c-5p	100	0,39	1,31	2,50E-07	0,77	77
hsa-miR-10b-5p	100	0,52	1,43	9,40E-07	0,76	76
hsa-miR-23b-3p	100	-0,27	-1,21	2,00E-06	0,75	75
hsa-miR-30a-5p	100	0,44	1,36	3,50E-06	0,75	75
hsa-miR-30b-5p	100	0,25	1,19	6,50E-06	0,74	74
hsa-miR-191-5p	100	-0,54	-1,45	5,50E-05	0,72	72
hsa-miR-151a-3p	95	-0,8	-1,74	3,60E-06	0,75	71,25
hsa-miR-31-3p	89	-1,2	2,3	1,20E-07	0,79	70,31
hsa-miR-378a-3p	96	-0,8	-1,75	2,20E-05	0,73	70,08
hsa-miR-29c-3p	100	0,54	1,45	2,30E-04	0,7	70
hsa-miR-151a-5p	100	-0,38	-1,3	2,50E-04	0,7	70
hsa-miR-148a-3p	98	0,8	1,74	2,00E-04	0,71	69,58
hsa-miR-200a-3p	100	-0,33	-1,26	5,70E-04	0,69	69
hsa-miR-204-5p	100	0,48	1,39	6,10E-04	0,69	69
hsa-miR-125b-5p	100	0,4	1,32	7,00E-04	0,68	68
hsa-miR-93-5p	100	-0,46	-1,38	8,50E-04	0,68	68
hsa-miR-10a-5p	100	0,67	1,59	1,10E-03	0,68	68
hsa-miR-29a-3p	98	0,53	1,44	4,80E-04	0,69	67,62
hsa-miR-362-3p	94	0,64	1,56	3,00E-04	0,71	66,74
hsa-miR-30a-3p	100	0,4	1,32	5,40E-03	0,66	66
hsa-miR-363-3p	98	0,63	1,55	2,10E-03	0,67	65,66
hsa-miR-135b-5p	99	-0,53	-1,45	3,80E-03	0,66	65,34
hsa-miR-99a-5p	100	0,34	1,26	5,40E-03	0,65	65
hsa-miR-135a-5p	97	0,76	1,7	2,20E-03	0,67	64,99
hsa-miR-375	97	1,15	2,21	2,50E-03	0,67	64,99
hsa-miR-331-3p	94	-0,64	-1,56	6,30E-04	0,69	64,86
hsa-miR-490-3p	98	1,04	2,06	3,60E-03	0,66	64,68
hsa-let-7b-5p	100	-0,32	-1,25	1,30E-02	0,64	64
hsa-miR-29b-3p	100	0,38	1,3	1,70E-02	0,64	64
hsa-miR-320c	90	-0,87	-1,83	2,00E-04	0,71	63,9
hsa-miR-106a-5p	100	0,32	1,24	1,80E-02	0,63	63
hsa-let-7c-5p	100	0,27	1,21	2,40E-02	0,63	63
hsa-miR-25-3p	95	-0,46	-1,38	5,30E-03	0,66	62,7
hsa-miR-425-5p	88	-0,66	-1,58	3,70E-04	0,71	62,48
hsa-miR-320b	96	-0,5	-1,41	6,70E-03	0,65	62,4
hsa-miR-146a-5p	70	-3,23	-9,4	3,80E-10	0,88	61,6
hsa-miR-660-5p	99	0,38	1,3	4,50E-02	0,62	61,38

hsa-miR-100-5p	94	0,53	1,44	1,20E-02	0,65	61,1
hsa-miR-140-3p	86	-0,58	-1,49	3,60E-04	0,7	60,2
hsa-miR-15b-5p	95	-0,42	-1,34	4,80E-02	0,62	58,9
hsa-miR-210-3p	86	-0,6	-1,51	2,00E-02	0,64	55,04
hsa-miR-130a-3p	78	0,78	1,71	5,00E-03	0,69	53,82
hsa-miR-200b-5p	85	-0,38	-1,3	3,40E-02	0,63	53,55
hsa-miR-223-3p	63	-3,81	-14	1,30E-07	0,83	52,29
hsa-miR-1972	56	-2,45	-5,45	6,00E-04	0,74	41,44
hsa-miR-142-3p	49	-3,48	-11,19	3,90E-07	0,83	40,67
hsa-miR-132-3p	47	-0,81	-1,76	4,70E-03	0,72	33,84
hsa-miR-425-3p	50	-0,71	-1,64	3,20E-02	0,66	33

En el conjunto combinado analizado en el ejemplo 5, el clasificador de 2 miR (miR-31-5p/miR-30c) mostró una precisión de diagnóstico basada en el análisis de la curva ROC de 0,9 (AUC).

- 5 Mientras que un miARN individual, o un biomarcador basado en razón pueden funcionar bien, puede aumentarse la robustez del clasificador para usar un panel de miARN.

Usando la simulación de Monte Carlo, se construyó un clasificador de diagnóstico de 20-miARN tal como se explicó anteriormente, dando como resultado una curva ROC tal como se observa en la figura 2. El análisis mostró un AUC=0,99 con una especificidad del 95,5% y una sensibilidad del 93,6%. El clasificador de 20 miARN consistió en: hsa-miR-132-3p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a.

15

Biomarcadores basados en razón

El potencial de diagnóstico de un miARN puede evaluarse mediante la curva característica operativa del receptor (ROC), usando el área bajo la curva (AUC) como una medición del rendimiento. A este respecto, el miARN-31-5p muestra el potencial más alto, teniendo un AUC del 89,9% en la cohorte de descubrimiento.

20

Potencialmente, varios miARN pueden complementarse entre sí en una prueba de diagnóstico, funcionando así mejor que cada miARN individual. Calculando la razón entre miARN-31-5p y los otros miARN en la cohorte, se descubrió que otros 12 miARN proporcionaron una puntuación de AUC mayor cuando se combinaron con miARN-31-5p que por sí solos (véase la tabla 7).

25

Tal como puede observarse en la tabla 7, la razón evaluada que mejor funciona en el AUC de la curva ROC es

$\frac{miR31}{miR1238}$. Sin embargo, hsa-miR-1238-3p sólo se expresa en el 3% de las muestras, y en consecuencia, tiene poco valor práctico. En cambio, si las razones se clasifican según el producto de AUC y la expresión, la razón $\frac{miR31}{miR30c}$

30

parece ser el biomarcador basado en razón de clasificación más alta seguido por $\frac{miR10b}{miR30c}$, $\frac{miR29c}{miR30c}$, $\frac{let7a}{miR30c}$, etc.

Tabla 7: lista de miARN que funcionan bien junto con miARN-31-5p. “Expresado” es una medición de en cuántos porcentajes de muestras se encuentra el miARN dado para expresarse. Los miR se clasifican según el producto de AUC y la expresión.

35

miARN	AUC (a)	% de expresado (E)	a×E
hsa-miR-30c-5p	0,899	100	89,9
hsa-miR-10b-5p	0,896	100	89,6
hsa-miR-29c-3p	0,895	100	89,5
hsa-let-7a-5p	0,894	100	89,4

hsa-miR-30a-5p	0,893	100	89,3
hsa-let-7e-5p	0,888	100	88,8
hsa-miR-29a-3p	0,896	98	87,808
hsa-miR-455-3p	0,891	82	73,062
hsa-miR-130a-3p	0,894	78	69,732
hsa-miR-22-5p	0,9	43	38,7
hsa-miR-136-5p	0,939	20	18,78
hsa-miR-1238-3p	1	3	3

Conclusión

5 Este ejemplo presentó un enfoque diferente para descubrir miARN con potencial de discriminación entre muestras de controles y pacientes con cáncer de próstata localizado (pacientes con PR). El análisis reveló una lista de 20 miARN en la que 5 de los miARN se descubrieron y validaron en los ejemplos 2 y 3. Los miARN con el impacto más alto sobre la puntuación de diagnóstico fueron miR-320 y miR-31-5p, seguidos por miR 16-5p.

Ejemplo 6

10

Título: especificidad para el cáncer de próstata

Objeto:

15 Verificar que las firmas identificadas son específicas para el cáncer de próstata.

Especímenes

20 Se muestreó un conjunto de muestras de orina de 25 pacientes con cáncer de vejiga y 8 individuos de control sin cáncer de vejiga y se procesó según el mismo protocolo aplicado en los ejemplos 1, 2 y 3.

Métodos

25 Los métodos usados son idénticos a los métodos usados en los ejemplos 1, 2 y 3.

Resultados

30 Entre los 20 microARN mejor clasificados con expresión aberrante significativa en cánceres de vejiga frente a controles, sólo tres microARN se superpusieron con aquellos identificados en el CP, siendo: hsa-miR-16-5p, hsa-miR-320a y hsa-miR-10b-5p. La gráfica de ROC para el fuerte clasificador de 2-miR de diagnóstico de CP (miR-31-5p, miR-30c) se muestra en la figura 3 para cáncer de vejiga frente a controles, mostrando un valor de discriminación muy bajo.

Ejemplo 7

35

Título: el método UniRT

Objeto:

40 En este ejemplo, se describe de manera breve el método UniRT para la amplificación y la cuantificación de pequeñas moléculas de ARN no codificantes mediante el uso de la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR). Puede observarse una descripción adicional en el documento EP2391736.

45 De manera breve, véase la fig. 4, el protocolo de UniRT es un protocolo de dos etapas. En la etapa 1, a los miR presentes en una muestra se les añade una cola de poli-A en primer lugar usando una poli(A) polimerasa, que añade residuos de adenina al extremo 3' de moléculas de ARN. En segundo lugar, se hibrida un cebador de extensión, que tiene una secuencia de nucleótidos con núcleo de poli-T, un motivo degenerado de VN en el extremo 3' y una cola en el extremo 5', con los miR de cola poli-A a través de hibridación con la secuencia VN-poli-T del cebador de extensión. Posteriormente, el cebador de extensión se extiende en una reacción de transcripción inversa usando el miR como molde. El producto de extensión primario resultante se compone del cebador de extensión y el ADNc recién sintetizado, que es complementario a los miR en la muestra.

50

En la siguiente etapa, la etapa 2, se lleva a cabo una PCR específica de miR. Se hibrida un cebador directo específico de miR al extremo 3' del ADNc recién sintetizado, y se lleva a cabo la síntesis de cadena superior extendiendo el cebador directo en una reacción de polimerización de ADN usando el producto de extensión primario como molde. Luego se hibrida un cebador inverso específico de miR que se compone de una secuencia de extremo 3' específica de miR, un tramo de poli-T y una cola de extremo 5' con la cadena superior, y la cadena inferior se sintetiza mediante la extensión del cebador inverso.

Tanto en la etapa 1 como en la etapa 2, LNA ayuda a asegurar una hibridación específica y eficaz de los cebadores con sus respectivas dianas.

El método UniRT de Exiqon (PCR para microARN miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR) proporciona resultados con sensibilidad y especificidad inigualables, véase Mestdagh *et al.* Nat Methods. Agosto de 2014;11(8):809-15,

15 Ejemplo 8

Título: descubrimiento mejorado de clasificadores de microARN en orina libre de células fraccionada de exomas

20 Objeto del estudio

Identificar microARN con capacidad de diagnóstico para discriminar entre estados benignos y cancerosos.

Especímenes

25 Todas las muestras de orina se recogieron en el Departamento de Urología y se obtuvieron del Instituto de Patología, Hospital de la Universidad de Aarhus, Dinamarca (de 1997-2005). Para todos los individuos, un patólogo cualificado evaluó secciones de especímenes de tejido embebido en parafina fijadas en formalina teñidas con H&E. La cohorte de entrenamiento (cohorte 4 - (V)) consistió en 22 muestras no malignas (NM; de pacientes con HPB (controles), 200 muestras de pacientes con RP destinada de manera curativa de CP clínicamente localizado e
30 histológicamente verificado.

Tabla 8

	Cohorte					
	1	2	De descubrimiento combinada 1+2	3 "Sheffield"	4 de descubrimiento del ejemplo 8	5 "Nueva" validada
HPB (no maligna)	8	47	48	34	22	22
CPRC	5	3	5			
PR	122	98	205	20	200	205
PR+después del final	1	0	1			

35 Método

La preparación de muestras y la obtención del perfil de la expresión de microARN se realizó tal como se describió en el ejemplo 1.

40 Filtrado y normalización de datos

Se excluyeron los microARN para los que todos los valores de Cq excedían 37 en todas las muestras del análisis adicional. Para excluir cualquier muestra de baja calidad, se retiró cualquier muestra en la que el número total de miARN expresados se encontraba por debajo del 50% del máximo potencial. Para seleccionar sólo los ensayos expresados de manera robusta, se retiraron los ensayos de microARN que se expresaron en menos del 80% de las
45 muestras y también se retiraron los ensayos con un valor de Cq promedio por encima de 35.

La normalización de la cohorte 4 se realizó calculando un valor de normalización medio de los tres mejores ensayos expresados de manera más estable identificados mediante el algoritmo de NormFinder (40): hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-30b-5p.

Construcción del clasificador – regresiones logísticas múltiples

Dadas dos categorías (benigna y cancerosa), es posible usar regresión logística para modelar la probabilidad de que un paciente dado pertenezca a una categoría particular. Usando un modelo de regresión logística múltiple, se pudo incluir más de una variable independiente (medición de ensayo de microARN).

- 5 La probabilidad ($p(X)$) de que una característica esté presente dados los valores de variables explicativas, en este caso una única variable categórica ($p(X) = (Y = 1|X = x)$), es decir la probabilidad de que el paciente tenga cáncer dado el valor de Cq estimado, puede expresarse mediante el siguiente modelo:

$$p(X) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p}}$$

10 en el que $X=(X_1, \dots, X_p)$ son un conjunto de variables explicativas, en este caso los valores de ΔCq para un ensayo de microARN particular, y β_0, \dots, β_p son los coeficientes. Los ensayos de microARN se seleccionaron mediante la regresión LASSO (operador de selección y contracción mínima absoluta) y los coeficientes se estimaron mediante el método de máxima verosimilitud.

15 Selección de paneles de microARN

20 La regresión Lasso se usó como el método estadístico para identificar paneles de microARN con potencial de diagnóstico óptimo. Para seleccionar de microARN con una razón señal con respecto a ruido suficiente, sólo se incluyeron los miARN que mostraron al menos un cambio en veces de 1,75 en el conjunto de descubrimiento entre sujetos normales y con CP. Dado que la regresión logística requiere un conjunto de datos completo, se usó la técnica de imputación múltiple para completar los valores faltantes. La imputación se realizó usando el paquete R "mice".

25 Luego se realizó la regresión Lasso usando el paquete R glmnet para encontrar qué variables independientes usar. De manera breve, la de regresión Lasso introduce una penalización (λ) que reduce los coeficientes hasta cero cuando se aumenta λ . Cuanto más contribuya una variable independiente (un ensayo de microARN) al modelo, mayor tendrá que ser el valor de λ antes de que su β se convierta en cero (véase <http://www-bcf.usc.edu/~garet/ISL/> página 219 para una explicación completa de la regresión Lasso). Los coeficientes se redujeron como resultado de
30 aumentar λ y la desviación en una validación cruzada usando cv.glmnet indicó que usar 3 ó 7 variables independientes (microARN) pareció ser óptimo.

35 El potencial de diagnóstico de paneles de microARN se evaluó usando análisis de ROC usando el valor p del modelo de regresión logística.

Resultados

40 Los 10 microARN mejor clasificados se muestran en la tabla 9. La regresión Lasso indicó que usar 3 ó 7 variables independientes (microARN) pareció ser óptimo.

Tabla 9a: clasificación de microARN y lista de paneles identificados (basándose en la regresión Lasso). Los clasificadores se redujeron desde 10 microARN (miR10) hasta un microARN (miR1).

La 'x' indica que el microARN se incluye en el panel de biomarcador miR dado, es decir el panel miR3 es hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p y hsa-miR-24-3p

Clasificación	Ensayo	Paneles de biomarcadores									
		miR1	miR2	miR3	miR4	miR5	miR6	miR7	miR8	miR9	miR10
1	hsa-miR-31-5p	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	hsa-miR-141-3p		X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	hsa-miR-24-3p			X	X	X	X	X	X	X	X
4	hsa-miR-31-3p				X	X	X	X	X	X	X
5	hsa-miR-16-5p					X	X	X	X	X	X
6	hsa-miR-222-3p						X	X	X	X	X

7	hsa-miR-331-3p							X	X	X	X
8	hsa-miR-375								X	X	X
9	hsa-miR-378a-3p									X	X
10	hsa-miR-205-5p										X

Tabla 9b: precisión de diagnóstico de los paneles de biomarcadores (miR1 - miR10) dados mediante los valores de AUC; el área bajo la curva operativa del receptor (ROC) en el conjunto de descubrimiento/entrenamiento, el conjunto de validación completo y la subpoblación de uso previsto.

5

Panel de miR	Ensayos incluidos	Datos completos		PSA <= 10
		Descubrimiento	Validación	Validación
1	hsa-miR-31-5p	0,917	0,805	0,820
2	hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p	0,934	0,836	0,854
3	hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p	0,951	0,861	0,880
4	hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-31-3p	0,951	0,862	0,880
5	hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-16-5p	0,951	0,847	0,863
6	hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-222-3p	0,958	0,860	0,873
7	hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-222-3p hsa-miR-331-3p	0,959	0,875	0,889
8	hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-222-3p hsa-miR-331-3p, hsa-miR-375	0,958	0,872	0,884
9	hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-222-3p hsa-miR-331-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-378a-3p,	0,960	0,868	0,882
10	hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-222-3p hsa-miR-331-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-205-5p	0,958	0,872	0,890

Los ensayos de microARN individuales con la precisión de diagnóstico más alta fueron hsa-miR-31-5p con un AUC de 0,92, "PSA <= 10" designa que una medición convencional previa de antígeno prostático específico (PSA) ha indicado que el nivel de PSA sérico es de 10 ng/ml o menor en el paciente individual (o sujeto).

Los dos microARN posteriores (clasificación 2 y 3) añadieron ambos una precisión significativa al clasificador: hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p, alcanzando un AUC de 0,95 (corte: 0,94).

- 10 El panel de microARN con la precisión de diagnóstico más alta fue un clasificador de 7 miR: hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-331-3p, con un área bajo la curva ROC (AUC) de 0,96 (corte: 0,94). La adición de más ensayos no aumentó el poder discriminatorio de manera adicional.

15 Conclusión

Se pudieron identificar varios paneles de microARN de biomarcadores de diagnóstico novedosos que discriminaron entre estados benignos y cancerosos con una precisión muy alta (AUC>0,95).

Ejemplo 9

5 Título: validación del rendimiento de diagnóstico de los paneles de biomarcadores de microARN identificados

Objeto

10 Validar el rendimiento de diagnóstico, los paneles de biomarcadores de 10 miR (también denominados clasificadores de biomarcadores o miR distintivos) que se identificaron en el ejemplo 8.

Especímenes

15 Las muestras se recogieron y se manipularon tal como se describió en el ejemplo 8. La cohorte de validación consistió en 22 muestras no malignas (NM; de pacientes con HPB (controles), 205 muestras de pacientes con RP destinada de manera curativa de CP clínicamente localizado e histológicamente verificado (tabla 8).

Método

20 *Obtención del perfil, normalización y filtrado de datos de la expresión de microARN*

25 Como en el ejemplo 8, excepto usando un lote de producción diferente de PCR lista para usar de microARN, un panel de PCR de microARN Pick-&-Mix (hecho a medida; artículo n.º 174845) con la misma configuración exacta que en el ejemplo 8.

Resultados

30 El potencial de diagnóstico de los paneles (o clasificadores) definidos en la cohorte 4 se validó en la cohorte 5 usando análisis de ROC. Los resultados se muestran en la tabla 9b (véase el ejemplo 8).

35 El clasificador de microARN individual (hsa-miR-31-5p) mostró una precisión de diagnóstico de 0,81 en la cohorte de validación, mientras que cada uno de los dos microARN posteriores (hsa-miR-141-3p y hsa-miR-24-3) añadió un aumento considerable a la precisión de diagnóstico, alcanzando un AUC de 0,86 (véase también la figura 5). Los paneles de microARN con la precisión de diagnóstico más alta en la discriminación entre estados benignos y cancerosos en el conjunto de descubrimiento; el clasificador de 7-miR se validó para un AUC de 0,88 (figura 6).

Conclusión

40 Los clasificadores de diagnóstico miR n.ºs 1 a 10 (diagnóstico de miR distintivos, o paneles de biomarcadores diagnóstico n.ºs 1 a 10) se validaron con éxito en una cohorte de validación independiente usando los valores umbrales establecidos en la cohorte 4. Varios de los paneles de microARN pudieron predecir un resultado positivo de una prueba de biopsia con una precisión de diagnóstico por encima de 0,86. El panel de biomarcador de microARN más óptimo fue el clasificador de 7-miR. Para una prueba de diagnóstico, son preferibles números bajos de ensayos debido al precio y a la complejidad de la prueba de diagnóstico. Por tanto, aparte del clasificador de 7 miR, los clasificadores de 3 miR (hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p y hsa-miR-24-3p) y de 4 miR (hsa-miR-31-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-24-3p y hsa-miR-31-3p) son candidatos de biomarcadores prometedores.

Ejemplo 10

50 Título: validación del panel de biomarcador de microARN identificado en la subpoblación de uso previsto

Objeto del estudio

55 Los paneles de biomarcadores pretenden usarse para apoyar la decisión clínica; se realice o no una biopsia, en pacientes con un resultado previo de la prueba de PSA en el “área de la zona gris” por debajo de 10 ng/ml. El objeto del estudio fue validar si los paneles de biomarcadores identificados pueden aplicarse a la subpoblación de pacientes con niveles de PSA por debajo de 10 ng/ml, y aún así discriminar entre estados benignos y cancerosos con una precisión de diagnóstico alta.

Especímenes

60 La cohorte fue un subconjunto de la cohorte de validación. Consistió en 19 muestras no malignas (NM; de pacientes con HPB (controles), y 83 muestras de pacientes con RP destinada de manera curativa de CP clínicamente localizado e histológicamente verificado con niveles de PSA por debajo de o igual a 10 ng/ml (tabla 8).

Método

Obtención del perfil, normalización y filtrado de datos de la expresión de microARN

5 Véase el ejemplo 9.

Resultados

10 El potencial de diagnóstico de los clasificadores definido en la cohorte 4 se validó en la subpoblación de la cohorte 5 (PSA<10) usando el análisis de ROC. Los resultados se muestran en la tabla 9.

15 El clasificador de microARN individual (hsa-miR-31-5p) mostró una precisión de diagnóstico de 0,82 en la cohorte de validación, mientras que los clasificadores de tres microARN (3-miR) mostraron un aumento considerable en la precisión de diagnóstico hasta un AUC de 0,88 en línea con el estudio de descubrimiento en el ejemplo 8. El panel de microARN de 7-miR que mostró la precisión de diagnóstico más alta en la discriminación entre estados normales y cancerosos en la cohorte de descubrimiento también se encontró que mantenía el poder discriminatorio más alto en la cohorte de validación con un AUC de 0,89. La adición de más microARN al panel no mejoró el panel de biomarcador como se observó en la cohorte de descubrimiento.

20 Conclusión

25 Se ha validado el potencial de biomarcador de diagnóstico de varios paneles de microARN en una cohorte independiente que consistía en la población de uso previsto; pacientes con niveles de PSA por debajo de 10 ng/ml. Varios de los paneles de microARN pudieron predecir un resultado positivo de una prueba de biopsia con una precisión de diagnóstico por encima de 0,88.

Ejemplo 11

30 Título: biomarcadores basados en razón para diagnóstico

Objeto del estudio

35 Una firma de biomarcador de microARN basado en razón tendría la ventaja considerable de aumentar la diferencia de detección eludiendo la necesidad de normalización y reduciéndose así el número de ensayos necesarios para obtener la precisión de diagnóstico. El objeto de este estudio fue descubrir clasificadores basados en razón con potencial de diagnóstico para discriminar entre estados benignos y cancerosos.

Especímenes

40 Tal como se usó en el ejemplo 8 (cohorte de descubrimiento).

Método

45 *Obtención del perfil y filtrado de datos de la expresión de microARN*

Datos del ejemplo 8 - sin normalización.

Construcción de clasificadores - clasificadores de razón

50 De manera breve, se crearon todos los posibles pares de miARN del agrupamiento de 92 (n = 4186). Luego, se retiraron los pares que no se expresaron en al menos el 95% de todas las muestras y se calculó el AUC para la razón entre los pares restantes (n = 823). A partir de los 10 microARN mejores pares de razón, se crearon todas las posibles razones de 3-miR.

55 Resultados

60 Los únicos clasificadores basados en razón de 3-miR que añadieron un poder de diagnóstico por encima de los clasificadores basados en razón de 2-miR fueron: hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30a-5p y hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30c-5p (mostrados en la tabla 10), con un AUC de 0,96 para ambos (sensibilidad y especificidad > 0,9, corte de 2 y sensibilidad de 88, especificidad de 95, corte > 6, respectivamente) (figura 7).

Tabla 10: firma de biomarcadores de microARN basados en razón						
Paneles basados en razón	microARN 1	microARN 2	microARN 3	Descubrimiento de AUC	AUC validación de Conjunto	Validación de AUC PSA < 10

					datos completo	
3miR_1	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-30a-5p	0,956	0,870	0,878
3miR_2	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-30c-5p	0,955	0,892	0,907

El algoritmo de puntuación para un clasificador de razón de 3-miR puede expresarse como:

$$Puntuación(S) = \frac{X_1 * X_2}{(X_3)^2}$$

5 en la que $X_1 - X_3$ son un conjunto de valores determinados experimentalmente (mediciones) en relación con el nivel de expresión de 3 miR diferentes. En el caso preferido, el valor de Cq para los ensayos de microARN particulares el clasificador se usa como una medición del nivel de expresión.

10 Como los valores de Cq están en una escala logarítmica, la puntuación también puede expresarse como:

$$Puntuación = Cq_1 + Cq_2 - 2 * Cq_3$$

en la que $Cq_1 - Cq_3$ son los valores de Cq observados para 3 miR diferentes.

15 Los clasificadores basados en razón seleccionados eluden la necesidad de normalización:

$$Puntuación = \frac{\frac{X_1}{N} * \frac{X_2}{N}}{\frac{X_3}{N} * \frac{X_3}{N}} = \frac{X_1 * X_2}{(X_3)^2}$$

20 en la que X son los valores de Cq para la medición de microARN y N es el factor de normalización (seleccionado comúnmente).

Conclusión

25 Se identificaron dos clasificadores de microARN basados en razón con potencial de diagnóstico prometedor en la predicción de resultados de biopsia positivos.

Ejemplo 12

30 Título: validación de los clasificadores de 3 miR en el conjunto de datos completo

Objeto del estudio

35 Validación del potencial de biomarcador de dos clasificadores basados en razón de 3 miR identificados - en una cohorte de pacientes independiente.

Especímenes

40 Como en el ejemplo 9 (es decir, cohorte 5, tabla 8)

Métodos

Obtención del perfil y filtrado de datos de la expresión de microARN

45 Datos del ejemplo 9 - sin normalización.

Resultados

50 El potencial de diagnóstico de los dos clasificadores basados en razón de 3-miR: hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30a-5p y hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30c-5p con el corte establecido en la cohorte 1 se validó en la cohorte 2 usando el análisis de ROC. La precisión de diagnóstico definida por el área bajo la curva ROC para los dos clasificadores fue de 0,87 (sensibilidad de 0,89, especificidad de 0,76, corte > 2) y 0,89 (sensibilidad de 0,78, especificidad de 0,95, corte > 6), respectivamente (figura 8).

Cuando la puntuación de diagnóstico S se calcula como:

$$S = C(\text{hsa-miR-24-3p}) + C(\text{hsa-miR-222-3p}) - (2 \times C(\text{hsa-miR-30a-5p})),$$

5 se observa que:

Aceptando el 1% de falsos negativos, entonces una puntuación de diagnóstico (S) > 0,5 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia.

10 Aceptando el 2% de falsos negativos, entonces una S > 0,9 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia. Y

Aceptando el 5% de falsos negativos, entonces una S > 1,8 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia.

De manera similar, cuando la puntuación de diagnóstico S se calcula como

15
$$S = C(\text{hsa-miR-24-3p}) + C(\text{hsa-miR-222-3p}) - (2 \times C(\text{hsa-miR-30c-5p})),$$

se observa que:

20 Aceptando el 1% de falsos negativos, entonces una puntuación de diagnóstico (S) > 5 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia.

Aceptando el 2% de falsos negativos, entonces una S > 5,1 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia. Y

25 Aceptando el 5% de falsos negativos, entonces una S > 5,8 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia.

Conclusión:

30 El potencial de diagnóstico de los dos clasificadores de microARN basados en razón identificados se validó con éxito en una cohorte de validación independiente usando un valor umbral similar al establecido en la cohorte de descubrimiento. La precisión de los clasificadores de diagnóstico de 3 miR fue alta, con un AUC de más de 0,87.

Además, se concluyó que una puntuación de diagnóstico S puede calcularse para ambos clasificadores de 3 miR y usarse para decidir el tratamiento adicional del paciente.

35

Ejemplo 13

Título: validación de los clasificadores basados en razón en la subpoblación de uso previsto

40 Objeto del estudio

El objeto de este estudio es validar si los clasificadores basados en razón identificados pueden aplicarse a la subpoblación de uso previsto; pacientes con niveles de PSA similares a o por debajo de 10 ng/ml, y todavía discriminar entre sujetos benignos y cancerosos con precisión de diagnóstico alta.

45

Especímenes

Datos de la cohorte 5

50 Métodos

Obtención del perfil y filtrado de datos de la expresión de microARN

Como en el ejemplo 9 - sin normalización.

55

Resultados

60 Los clasificadores de 3 miR (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30a-5p y hsa-miR-30c-5p y hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30c-5p) se validaron en la subpoblación (PSA ≤ 10 ng/ml) con una precisión de diagnóstico (AUC) de 0,88 (sensibilidad de 0,79, especificidad de 0,88) y 0,91 (sensibilidad de 0,88, especificidad de 0,95), respectivamente (figura 9).

Cuando la puntuación de diagnóstico, S, para un paciente con PSA ≤ 10 ng/ml se calcula como:

65
$$S = C(\text{hsa-miR-24-3p}) + C(\text{hsa-miR-222-3p}) - (2 \times C(\text{hsa-miR-30a-5p})),$$

se observa que:

5 Aceptando el 1% de falsos negativos, entonces una puntuación de diagnóstico (S) > 0,7 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia.

Aceptando el 2% de falsos negativos, entonces una S > 1,5 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia. Y

10 Aceptando el 5% de falsos negativos, entonces una S > 2 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia.

De manera similar, cuando la puntuación de diagnóstico S se calcula como

$$S = C(\text{hsa-miR-24-3p}) + C(\text{hsa-miR-222-3p}) - (2 \times C(\text{hsa-miR-30c-5p})),$$

15 se observa que:

Aceptando el 1% de falsos negativos, entonces una puntuación de diagnóstico (S) > 5 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia.

20 Aceptando el 2% de falsos negativos, entonces una S > 5,5 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia. Y

Aceptando el 5% de falsos negativos, entonces una S > 6 sugeriría que el paciente debe remitirse a biopsia.

Conclusión

25 El potencial del biomarcador de diagnóstico de los dos clasificadores basados en razón de 3 miR se validó con éxito en la subpoblación de uso previsto (PSA ≤ 10 ng/ml) de la cohorte 2 con una precisión de diagnóstico alta de 0,88 y 0,91, respectivamente. Los valores umbrales de diagnóstico que van a aplicarse en muestras clínicas estarían entre 0,5 y 2 (intervalo dinámico: [-3, +6] para el primer clasificador de 3 miR (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30a-5p y hsa-miR-30a-5p), y entre 4 y 6,5 (intervalo dinámico: [1, 10] para el segundo clasificador de 3 miR (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30c-5p).

30 Además, se concluyó que una puntuación de diagnóstico S puede calcularse para ambos clasificadores de 3 miR y usarse para decidir el tratamiento adicional del paciente.

Ejemplo 14

Título: prueba de robustez de clasificadores basados en razón en una cohorte independiente (cohorte 3 del ejemplo 4)

Objeto

45 Someter a prueba la robustez de los dos clasificadores basados en razón de tres-miR; es decir su potencial de diagnóstico para separar muestras de manera correcta en estados benignos y cancerosos, incluso en una cohorte que se muestreó y procesó según una metodología fundamentalmente diferente tal como se describió en el ejemplo 4.

Especímenes

50 Véase el ejemplo 4.

Métodos

55 Véase el ejemplo 4.

Resultados

60 Uno de los clasificadores de 3-miR (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30c-5p) clasificó estados benignos de estados cancerosos con una precisión (área bajo la curva ROC) de 0,79 (IC: de 0,68 a 0,87, p<<0,0001, sensibilidad y especificidad del 64% y el 84 %, respectivamente) véase la figura 11. El potencial de diagnóstico del otro clasificador de 3 miR basado en razón (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30a-5p) no pudo confirmarse (AUC de 0,66).

Conclusión

65 Aunque no es de esperar basándose en las diferencias fundamentales entre la cohorte 3 y la cohorte de

descubrimiento (cohorte 4); diferencia de la recolección y el procesado de especímenes, se confirmó el potencial de diagnóstico de uno de los clasificadores basados en razón. Este clasificador (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30c-5p) se validó con éxito en la cohorte 3 con una precisión de diagnóstico (AUC) de 0,79 en la discriminación entre estados benignos y cancerosos.

5

Tablas

Tabla 11.

Todos los miR en la nomenclatura de la versión 21 de miRBase	SEQ ID NO	Secuencia
hsa-let-7a-5p	1	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7b-5p	2	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU
hsa-let-7c-5p	3	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGUU
hsa-let-7e-5p	4	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7f-5p	5	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
hsa-let-7g-5p	6	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
hsa-miR-100-5p	7	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG
hsa-miR-106a-5p	8	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
hsa-miR-107	9	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC
hsa-miR-10a-5p	10	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG
hsa-miR-10b-5p	11	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
hsa-miR-1238-3p	12	CUUCCUCGUCUGUCUGCCCC
hsa-miR-125a-5p	13	UCCUGAGACCCUUUAACCUUGUG
hsa-miR-125b-5p	14	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA
hsa-miR-1260a	15	AUCCCACCUCUGCCACCA
hsa-miR-130a-3p	16	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU
hsa-miR-132-3p	17	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG
hsa-miR-135a-5p	18	UAUGGCUUUUUUAUCCUAUGUGA
hsa-miR-135b-5p	19	UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA
hsa-miR-136-5p	20	ACUCCAUUUGUUUGAUGAUGGA
hsa-miR-140-3p	21	UACCACAGGGUAGAACCACGG
hsa-miR-141-3p	22	UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG
hsa-miR-142-3p	23	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
hsa-miR-146a-5p	24	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
hsa-miR-148a-3p	25	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
hsa-miR-151a-3p	26	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG
hsa-miR-151a-5p	27	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU
hsa-miR-15b-5p	28	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA
hsa-miR-16-5p	29	UAGCAGCACGUAAUUAUUGGCG
hsa-miR-191-5p	30	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG
hsa-miR-1972	31	UCAGGCCAGGCACAGUGGCUCA
hsa-miR-19a-3p	32	UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA
hsa-miR-200a-3p	33	UAACACUGUCUGGUAAACGAUGU
hsa-miR-200b-3p	34	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA
hsa-miR-200b-5p	35	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA

ES 2 749 651 T3

hsa-miR-200c-3p	36	UAAUACUGCCGGGUAUAUGAUGGA
hsa-miR-203a-3p	37	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG
hsa-miR-204-5p	38	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
hsa-miR-205-5p	39	UCCUUCAUUCACCGGAGUCUG
hsa-miR-20a-5p	40	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG
hsa-miR-210-3p	41	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
hsa-miR-222-3p	42	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
hsa-miR-223-3p	43	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
hsa-miR-22-5p	44	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
hsa-miR-23a-3p	45	AUCACAUUGCCAGGGAUUUC
hsa-miR-23b-3p	46	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC
hsa-miR-24-3p	47	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
hsa-miR-25-3p	48	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA
hsa-miR-26a-5p	49	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
hsa-miR-27b-3p	50	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
hsa-miR-29a-3p	51	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-29b-3p	52	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa-miR-29c-3p	53	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-30a-3p	54	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC
hsa-miR-30a-5p	55	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
hsa-miR-30b-5p	56	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU
hsa-miR-30c-5p	57	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC
hsa-miR-30e-5p	58	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG
hsa-miR-31-3p	59	UGCUAUGCCAACAUUUUGCCAU
hsa-miR-31-5p	60	AGGCAAGAUUGCUGGCAUAGCU
hsa-miR-320a	61	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA
hsa-miR-320b	62	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA
hsa-miR-320c	63	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU
hsa-miR-331-3p	64	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA
hsa-miR-362-3p	65	AACACACCUAUUCAAGGAUUCA
hsa-miR-362-5p	66	AAUCCUUGGAACCUAGGUGUGAGU
hsa-miR-363-3p	67	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA
hsa-miR-375	68	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
hsa-miR-378a-3p	69	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC
hsa-miR-425-3p	70	AUCGGGAAUGUCGUGUCCGCC
hsa-miR-425-5p	71	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA
hsa-miR-455-3p	72	GCAGUCCAUGGGCAUAUACAC
hsa-miR-490-3p	73	CAACCUGGAGGACUCCAUGCUG
hsa-miR-660-5p	74	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUUG
hsa-miR-92a-3p	75	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
hsa-miR-93-5p	76	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
hsa-miR-99a-5p	77	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG
hsa-miR-99b-5p	78	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG

Bibliografía

- 5 1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, International journal of cancer Journal international du cancer. 2014.
2. Catalona (1996) The Prostate vol. 29, suplemento de publicación 7, págs 64-69
- 10 3. Carthew RW, Sontheimer EJ. Cell. 2009;136:642-55.
4. Zeng Y, Cullen BR. ARN. 2003;9:112-23.
- 15 5. Gregory RI, *et al.* Cell. 2005;123:631-40.
6. Kozomara A, Griffiths-Jones S. Nucleic Acids Res. 2014;42:D68-73.
7. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Genome research. 2009;19:92-105.
- 20 8. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. Annual review of pathology. 2014;9:287-314.
9. Bartels CL, Tsongalis GJ. Clin Chem. 2009;55:623-31.
10. Tong AW, *et al.* Cancer Gene Ther. 2009;16:206-16.
- 25 11. Verma *et al.* (2014) The Canadian Journal of Urology 21(3):7312-7321))
12. Huang *et al.* (2014) Am J Clin Exp Urol. 2(4): 343-350
- 30 13. Bustin, S.A. (ed.) A-Z of quantitative PCR, IUL Biotechnology Series 5 (2004) 882 páginas
14. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Cancer Res. 2004;64:5245-50.
- 35 15. Benjamini Y, Hochberg Y. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), 1995.
16. Damiński M, Rada-Iglesias, Enroth S, Wadelius C, Koronacki, *et al.* (2008) Bioinformatics (2008) 24(1):110-117.
- 40 17. Dyrskjot *et al.* Nature genetics. 2003;33:90-6.
18. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. Cancer 1950; 3:32-5.
19. Goessl (2001) Urology. Septiembre de 2001; 58(3):335-8.
- 45 20. Livak and Schmittgen (2001) METHODS 25, 402-408.
21. Tom Mitchell, Machine Learning, McGraw Hill, 1997.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para evaluar el riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata que comprende medir el nivel de expresión de un conjunto de miR, en una muestra de orina de dicho sujeto, en el que un nivel de expresión cambiado de dicho conjunto de miR, en comparación con donantes sanos, indica una probabilidad aumentada de que dicho sujeto padezca cáncer de próstata, en el que los conjuntos de miR son

hsa-miR-24-3p, hsa-miR-22-3p y hsa-miR30a-5p, y/o

hsa-miR-24-3p, hsa-miR-22-3p y hsa-miR30c-5p.
2. Método *in vitro* según la reivindicación 1 que comprende además medir el nivel de expresión de un miR seleccionado del grupo que consiste en hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1238-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-22-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-99a-5p y hsa-miR-99b-5p.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el conjunto de miR comprende 3, 4, 5 o más miR.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los niveles de expresión son niveles de expresión normalizados.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los niveles de expresión son niveles de expresión normalizados, realizándose la normalización calculando un valor de normalización medio de 5 miR que son: hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-23b-3p.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-4, en el que los niveles de expresión son niveles de expresión normalizados, realizándose la normalización calculando un valor de normalización medio de 3 miR que son: hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-27b-3p y hsa-miR-30b-5p.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de expresión de dicho miR se mide en una preparación de exosoma, preparada a partir de dicha muestra de orina.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto al que se le ha evaluado el riesgo de cáncer de próstata, se caracteriza porque una medición convencional previa de antígeno prostático específico (PSA) ha indicado que el nivel de PSA sérico está por debajo de 10 ng/ml.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de orina es de un sujeto que se ha sometido a masaje prostático inmediatamente antes de que se tomaran muestras de orina.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la evaluación del riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata implica detectar el nivel de dicho conjunto de miR en dicha muestra y calcular una puntuación de diagnóstico (S) basándose en un conjunto de datos que comprende los datos del nivel de expresión de dicho conjunto de miR.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de expresión de dicho conjunto de miR se determina mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).
12. Método según la reivindicación 10 u 11, en el que la puntuación de diagnóstico S se calcula como una razón del nivel de expresión de hsa-miR-30c-5p frente al nivel de expresión de hsa-miR-31-5p.
13. Método según la reivindicación 10 u 11, en el que la puntuación de diagnóstico S se calcula como una razón del nivel de expresión de hsa-miR-24-3p y hsa-miR-222-3p frente al nivel de expresión de hsa-miR-30a-5p.

14. Método según la reivindicación 10 u 11, en el que la puntuación de diagnóstico S se calcula como una razón del nivel de expresión de hsa-miR-24-3p y hsa-miR-222-3p frente al nivel de expresión de hsa-miR-30c-5p.

5 15. Método según la reivindicación 12, en el que la puntuación de diagnóstico S se calcula tal como sigue:

$$S = X * C(\text{hsa-miR-30c-5p}) + Y * C(\text{hsa-miR-31-5p})$$

10 en la que "C" es el valor de umbral de ciclo (Ct) o el valor de punto de cruce (Cp), y en la que X e Y son coeficientes determinados mediante regresión lineal.

16. Método según la reivindicación 13, en el que la puntuación de diagnóstico S se calcula tal como sigue:

$$S = C(\text{hsa-miR-24-3p}) + C(\text{hsa-miR-222-3p}) - (2 \times C(\text{hsa-miR-30a-5p}))$$

15 en la que "C" es el valor de umbral de ciclo (Ct) o el valor de punto de cruce (Cp) obtenido mediante PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) para hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-30a-5p, respectivamente.

20 17. Método según la reivindicación 14, en el que la puntuación de diagnóstico S se calcula tal como sigue:

$$S = C(\text{hsa-miR-24-3p}) + C(\text{hsa-miR-222-3p}) - (2 \times C(\text{hsa-miR-30c-5p}))$$

25 en la que "C" es el valor de umbral de ciclo (Ct) o el valor de punto de cruce (Cp) obtenido mediante PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) para hsa-miR-24-3p, hsa-miR-222-3p y hsa-miR-30c-5p, respectivamente.

18. Método según la reivindicación 10 u 11, en el que la puntuación de diagnóstico S se calcula como

$$\text{Puntuación (S)} = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p}}$$

30 en la que X = (X₁, ..., X_p) son los valores de ΔCq para ensayos de microARN particulares, obtenidos restando los valores Cq de datos sin procesar para cada muestra individual del valor de normalización para cada muestra individual, y β₀, ..., β_p son los coeficientes estimados mediante el método de máxima verosimilitud.

35 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el método determinar si el paciente tiene una probabilidad aumentada de que padezca cáncer de próstata, y seleccionar una terapia apropiada para el paciente basándose en esta información.

40 20. Kit para la evaluación *in vitro* del riesgo de que un sujeto padezca cáncer de próstata, que comprende alícuotas de los reactivos y cebadores necesarios para medir el nivel de expresión de un conjunto de miR, en una muestra de orina de dicho sujeto, en el que un nivel de expresión cambiado de dicho conjunto de miR, en comparación con donantes sanos, indica una probabilidad aumentada de que dicho sujeto padezca cáncer de próstata, en el que los conjuntos de miR son

hsa-miR-24-3p, hsa-miR-22-3p y hsa-miR30a-5p, y/o

hsa-miR-24-3p, hsa-miR-22-3p y hsa-miR30c-5p.

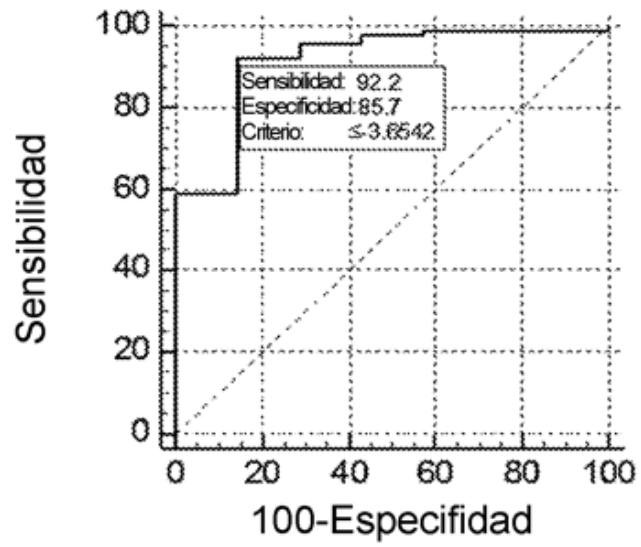
50 21. Kit según la reivindicación 20, que comprende además alícuotas de los reactivos necesarios para medir el nivel de expresión de un miR seleccionado del grupo que consiste en hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1238-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-22-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-425-

3p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-99a-5p y hsa-miR-99b-5p.

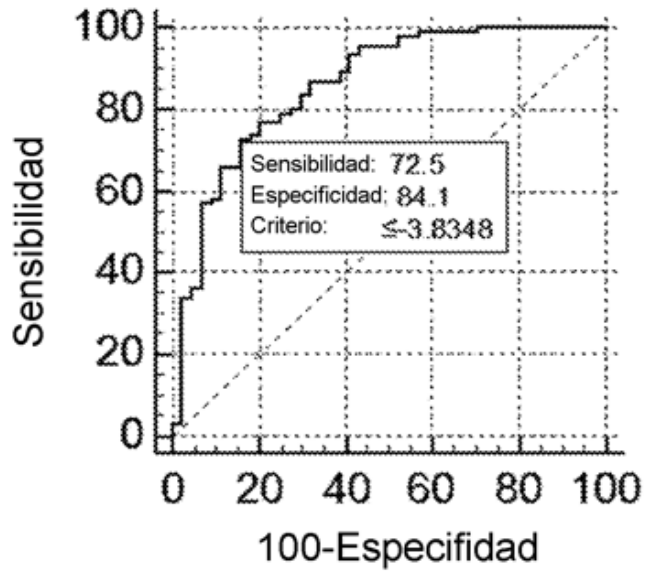
- 5
22. Kit según las reivindicaciones 20-21, que comprende además al menos un conjunto de referencia de datos de expresión de miARN de uno o más controles sanos.
 23. Kit según las reivindicaciones 20-22, que comprende además reactivos necesarios para obtener la preparación de exosoma de la muestra de orina.

Fig. 1

A



B



C

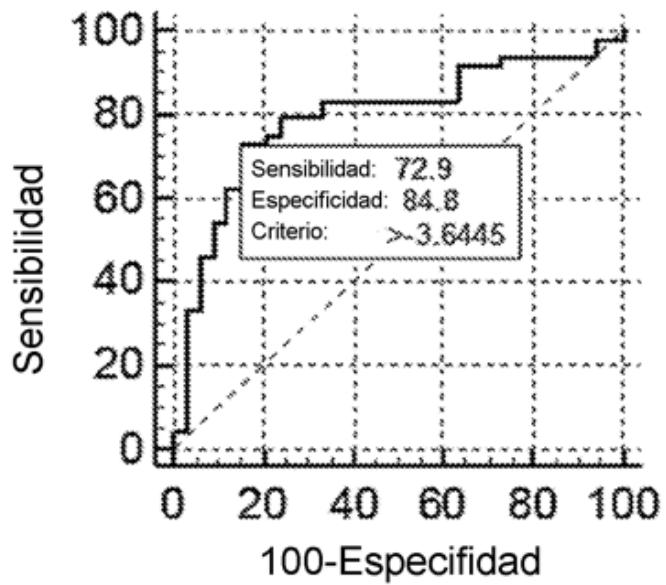


Fig. 2

clasificador de diagnóstico de 20-mir

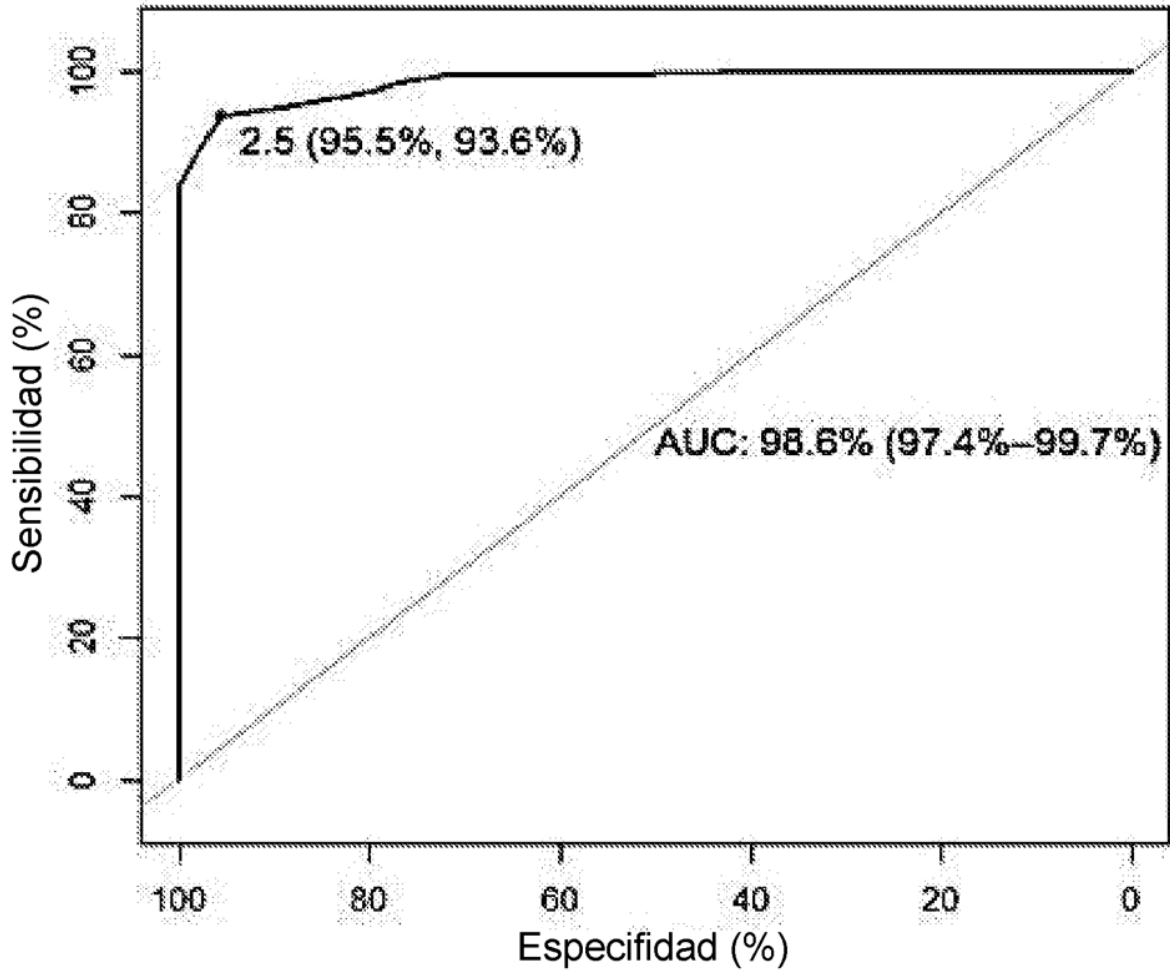


Fig. 3

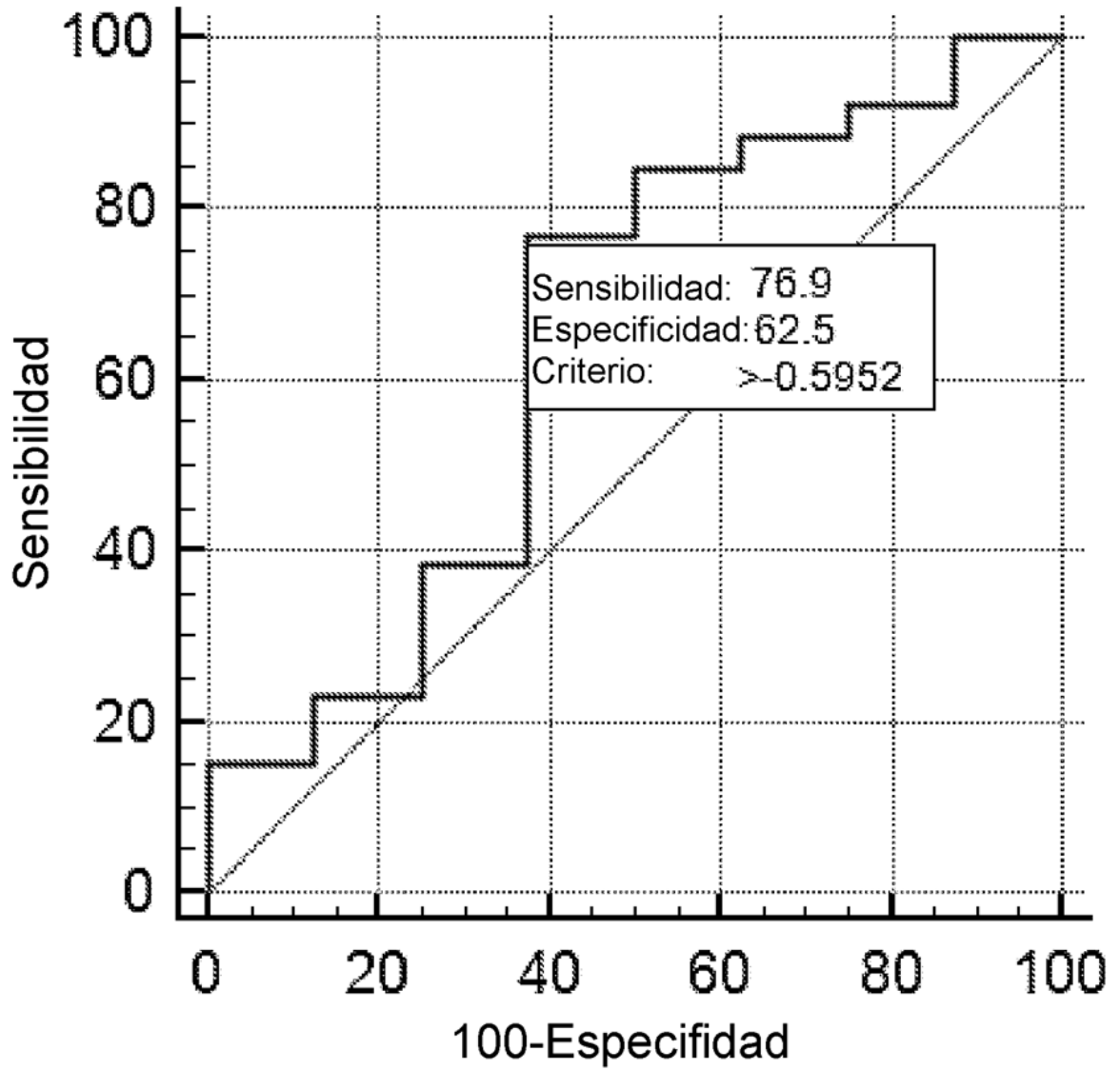


Fig . 4

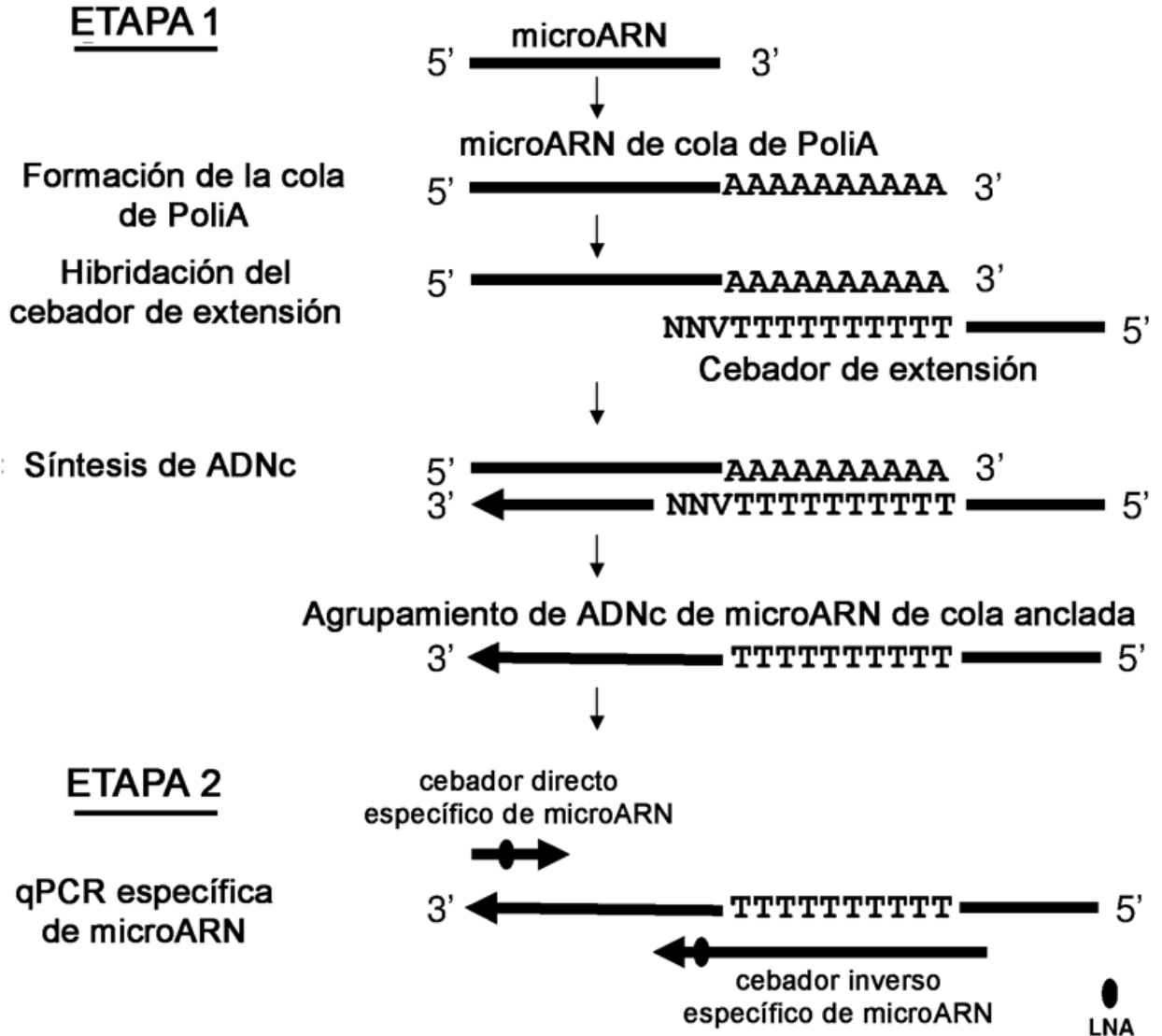


Fig . 5

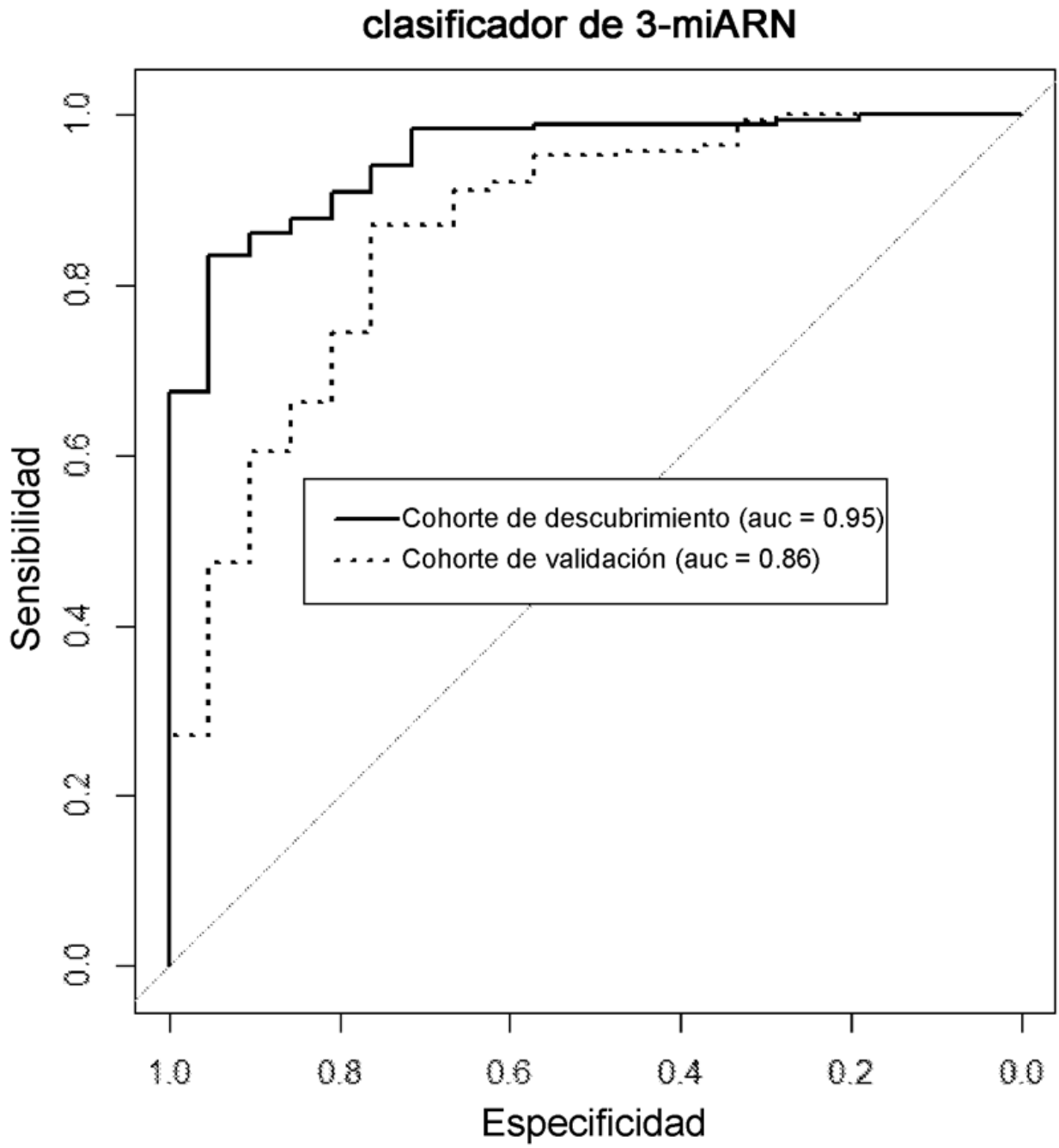


Fig. 6

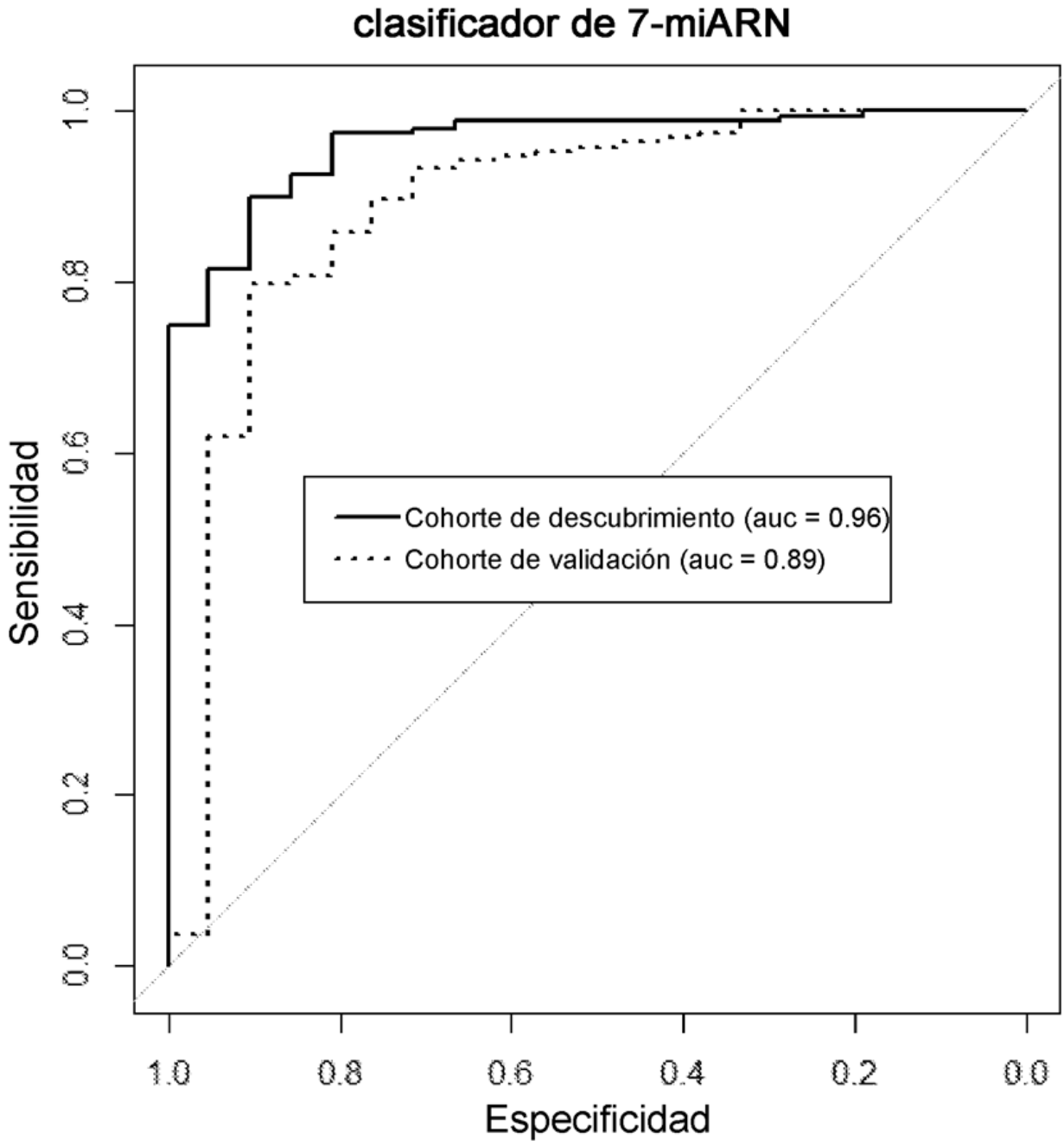


Fig. 7a

Clasificadores basados en razón 3miR_1 -
Cohorte de descubrimiento

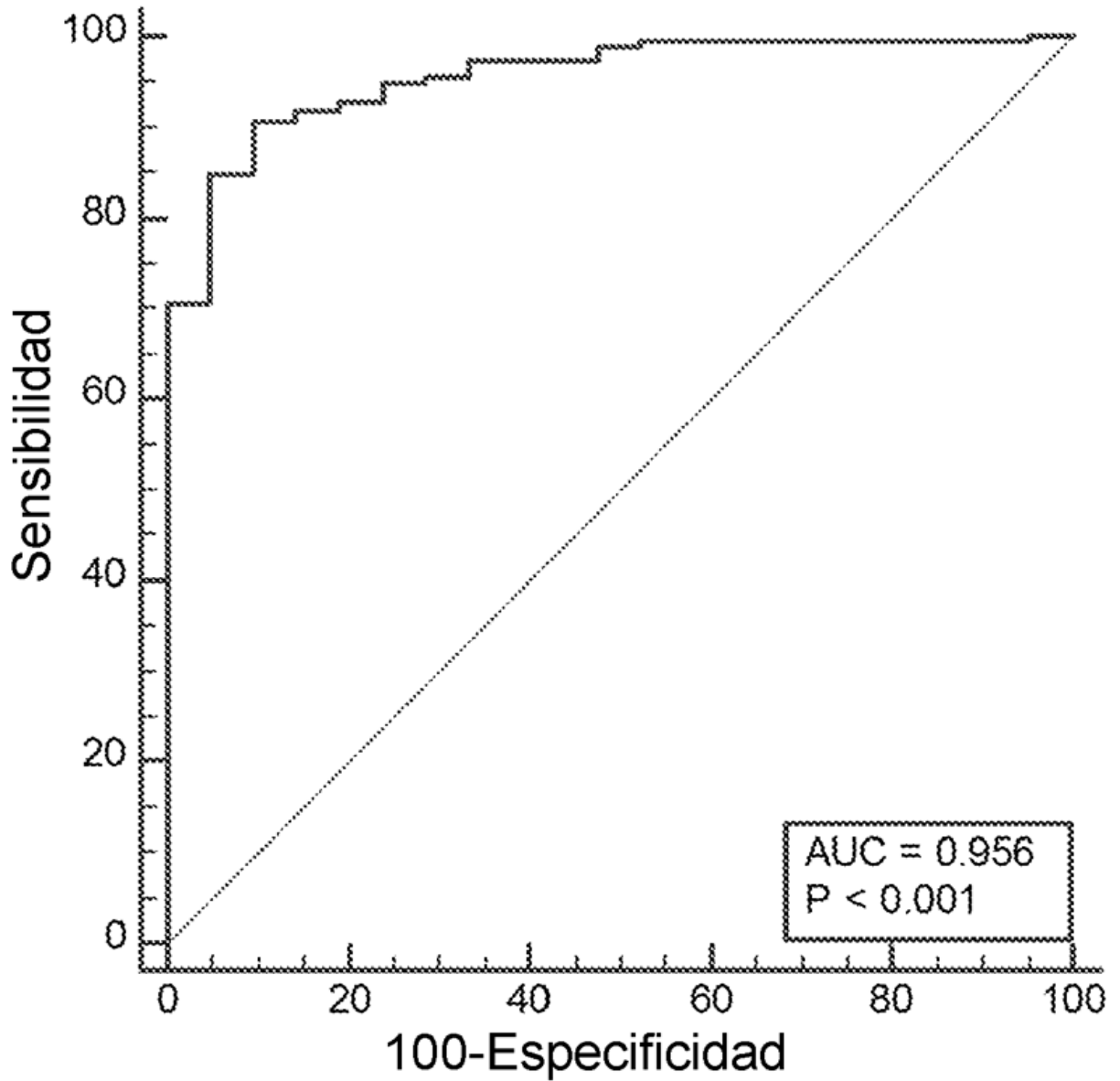


Fig. 7b

Clasificadores basados en razón 3miR_2 -
Cohorte de descubrimiento

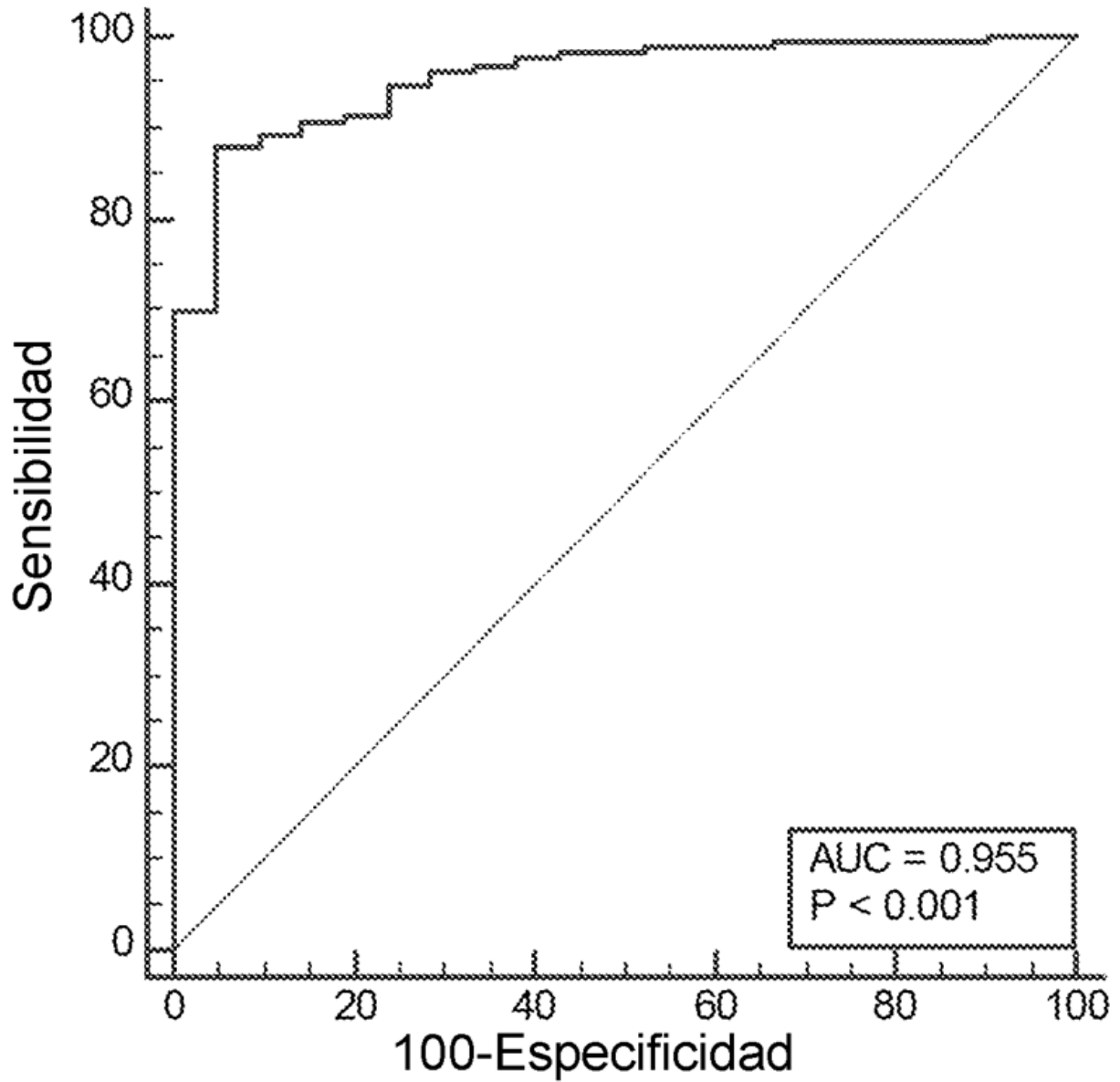


Fig. 8a

Clasificadores basados en razón 3miR_1 -
Cohorte de validación

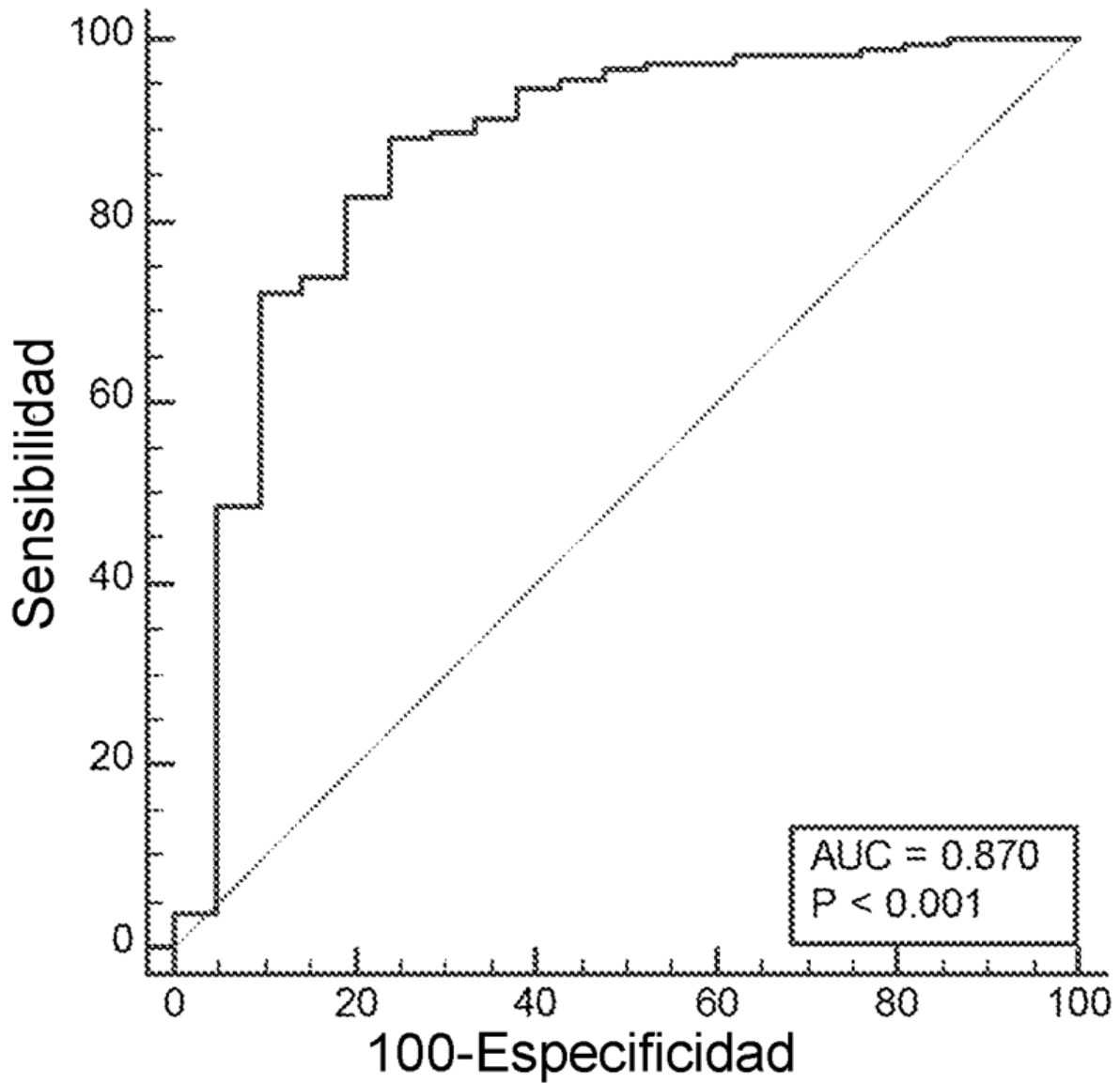


Fig. 8b

Clasificadores basados en razón 3miR_2 -
Cohorte de validación

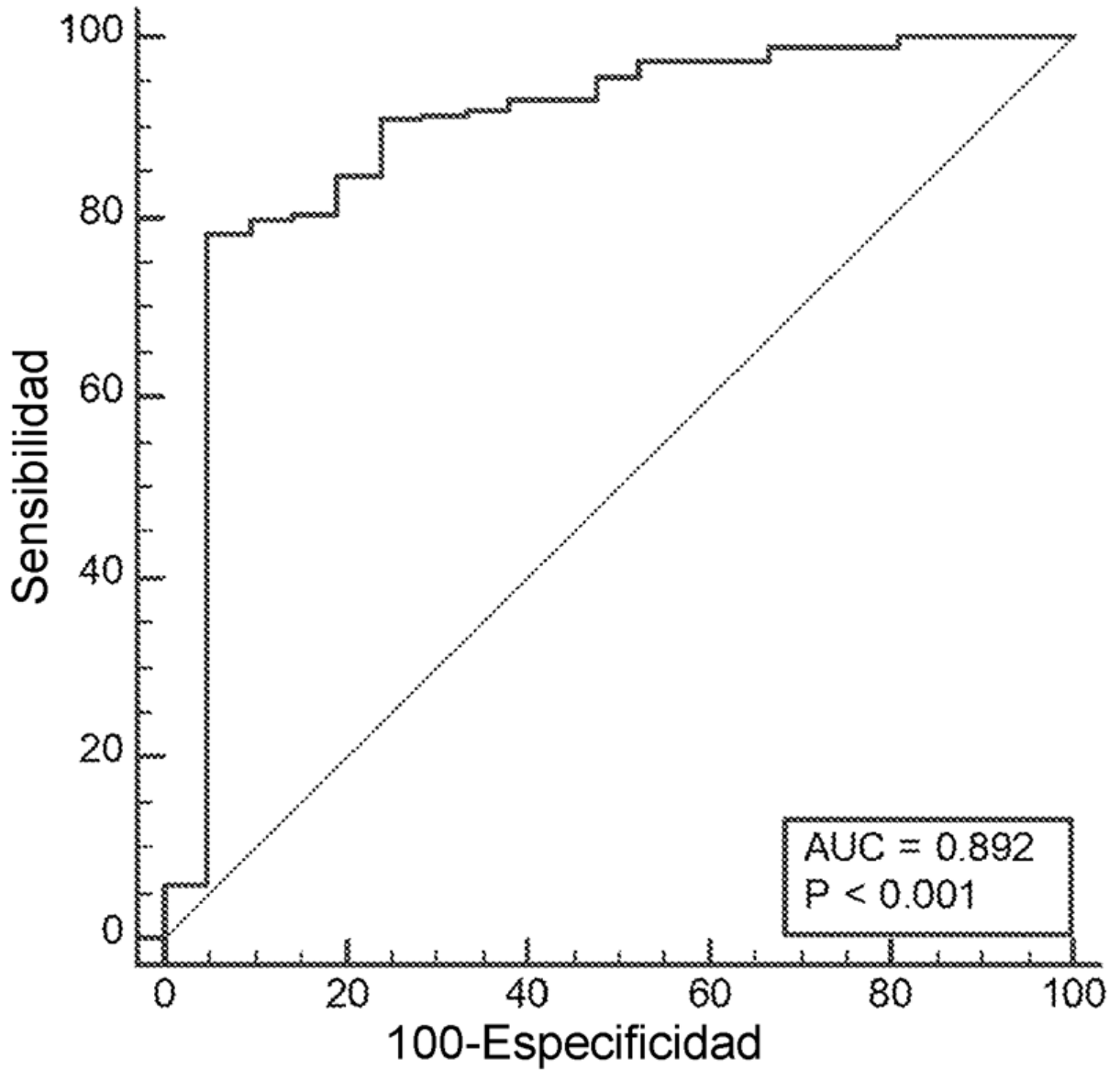


Fig. 9a

Clasificadores basados en razón 3miR_1 -
Cohorte de validación (PSA < 10 ng/ml)

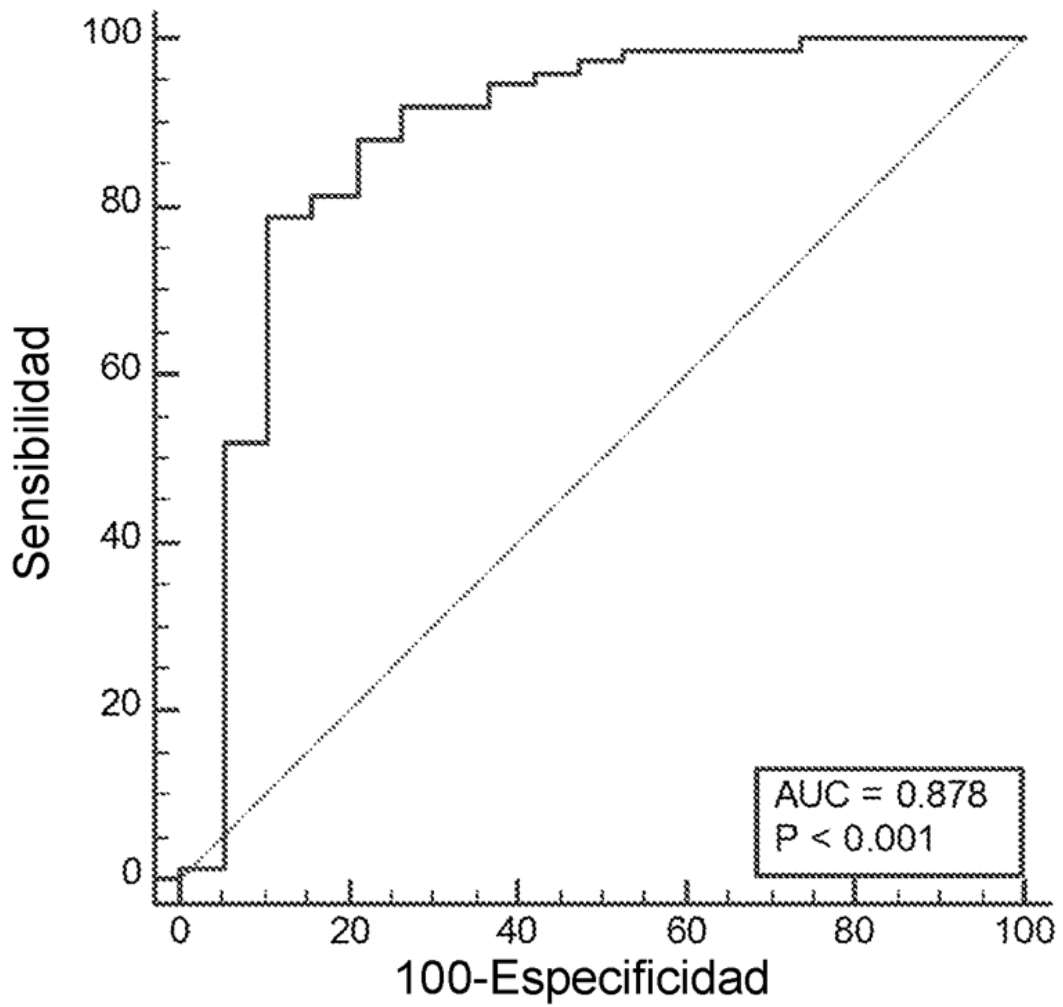


Fig. 9b

Clasificadores basados en razón 3miR_2 -
Cohorte de validación (PSA < 10 ng/ml)

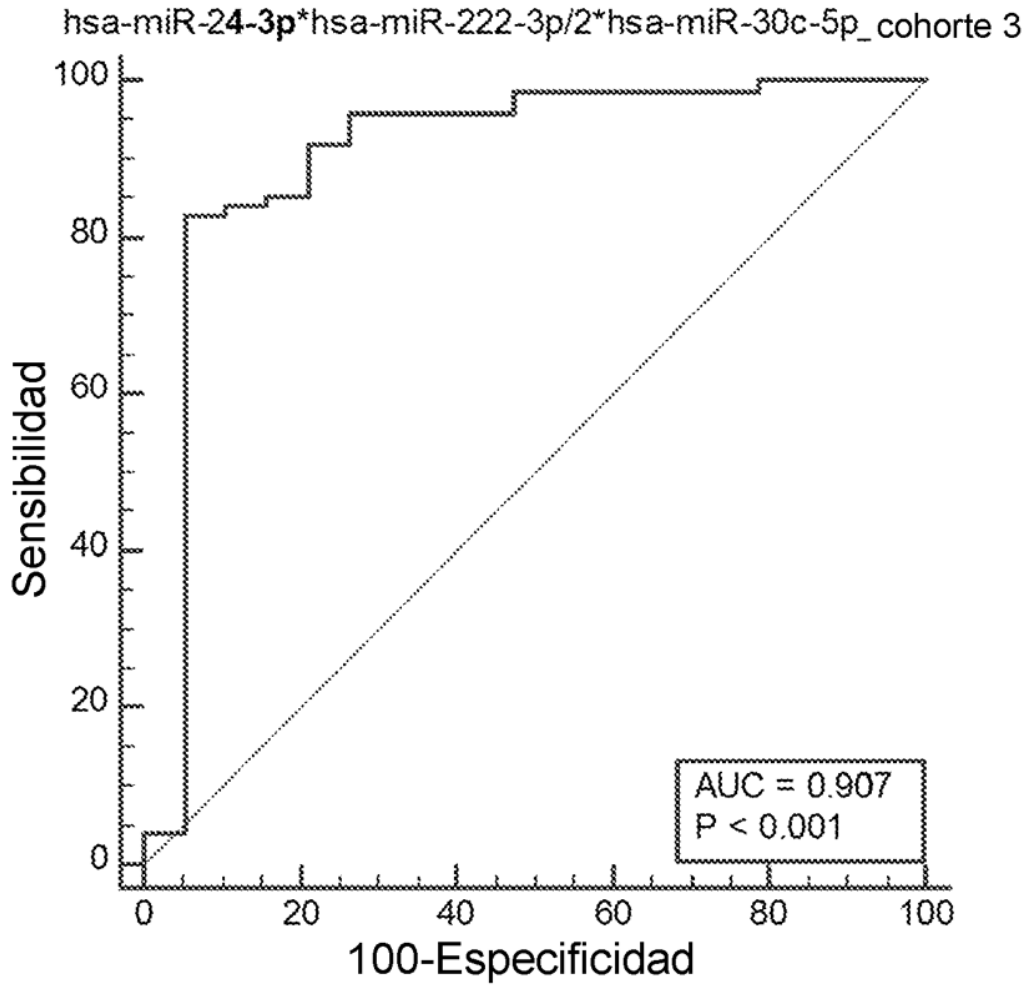


Fig. 10

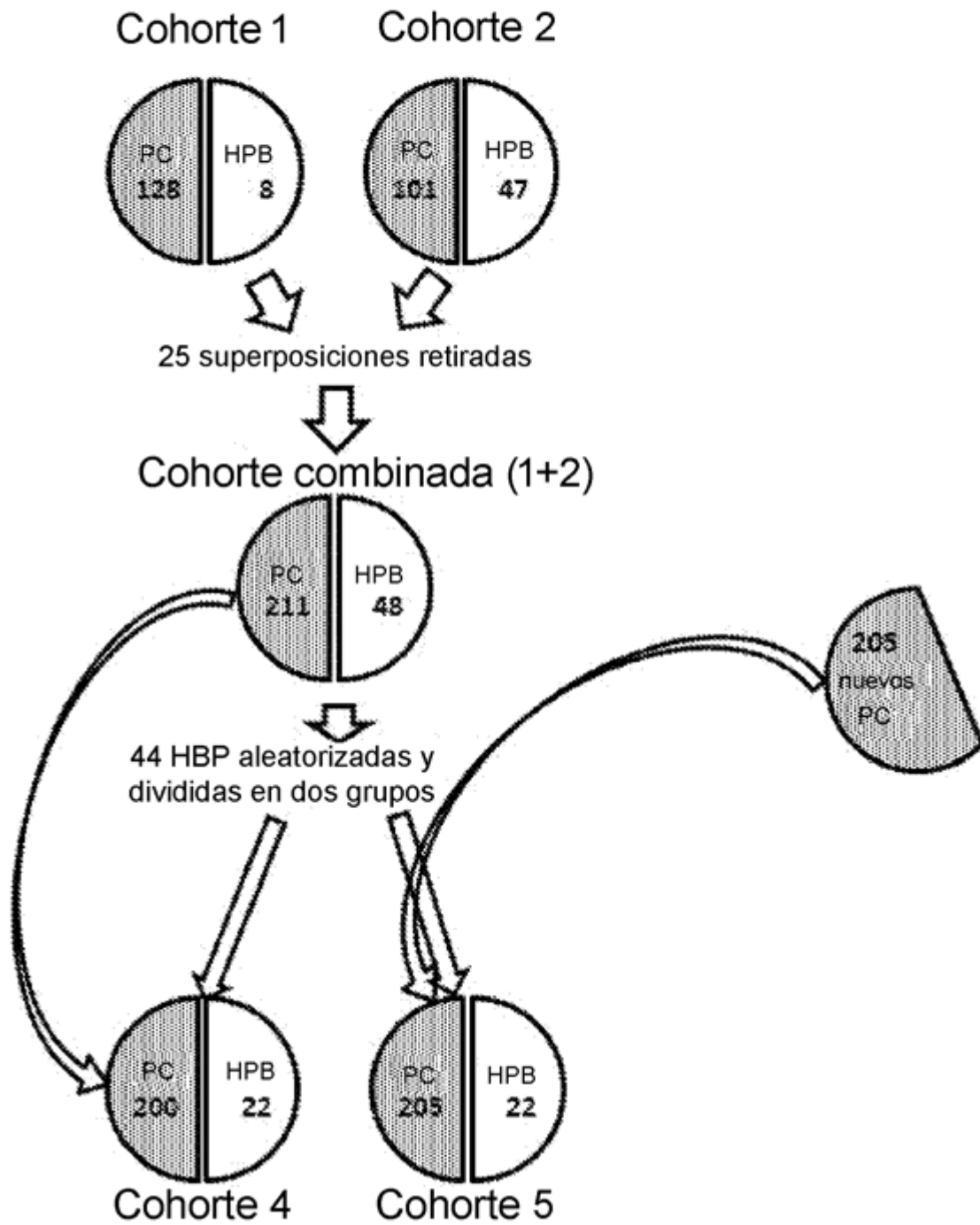


Fig. 11

3miR_2 basados en razón en la cohorte 3

