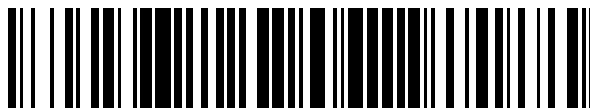


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 048 857**

21 Número de solicitud: 202430472

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

10.06.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.12.2025

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E
INNOVACIÓN BIOSANITARIA DEL PRINCIPADO
DE ASTURIAS -FINBA (50,00%)
Avda. Hospital Universitario s/n
33011 Oviedo (Asturias) ES y
UNIVERSIDAD DE OVIEDO (50,00%)**

72 Inventor/es:

**ENGUITA GONZÁLEZ, Jose María;
DÍAZ BLANCO, Ignacio;
CHIARA ROMERO, María Dolores y
VALDÉS GALLEGU, Nuria**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la
página web de la OEPM para su descarga en
formato electrónico

54 Título: **FIRMA DE miRNA ÚTILES EN LA DISCRIMINACIÓN DE TUMORES**

57 Resumen:

Firma de miRNA útiles en el diagnóstico de tumores
neuroendocrinos y adenocarcinomas.

La presente invención define dos biomarcadores
tisulares cuya expresión diferencial permite identificar
tumores neuroendocrinos y adenocarcinomas, como
el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) y los
tumores neuroendocrinos pancreáticos (PANNET).
Las diferencias en el tratamiento y el pronóstico
subrayan la necesidad de una diferenciación precisa
de estos tumores, que los miRNAs descritos
consiguen.

ES 3 048 857 A1

DESCRIPCIÓN

FIRMA DE miRNA ÚTILES EN LA DISCRIMINACIÓN DE TUMORES

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

10 La presente invención se refiere al campo de la medicina, concretamente al campo de la oncología. De forma más específica, la invención se encuadra dentro de las neoplasias de origen neuroendocrino, más preferible de origen gastroenteropancreático y más concretamente en un sistema de discriminación, identificación y diagnóstico de neoplasias de origen neuroendocrino frente a otros tipos de tumores, como el adenocarcinoma de páncreas y el tumor neuroendocrino de páncreas.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Los tumores neuroendocrinos constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias de tipo epitelial con una diferenciación predominantemente neuroendocrina. Aunque las localizaciones más frecuentes son el páncreas, el tracto digestivo y el pulmón, este tipo de neoplasias pueden surgir en prácticamente cualquier órgano del cuerpo, debido a que estas células se distribuyen en la etapa embrionaria por todo el organismo, a través de las crestas neurales, las glándulas endocrinas, los islotes pancreáticos y el sistema endocrino difuso de paraganglios.

25

30 Las células neuroendocrinas se caracterizan por producir una serie de moléculas (neuropéptidos, neuromodulares o neurotransmisores) que tienen función hormonal. Estos compuestos se almacenan en los gránulos de secreción, dentro de las células y son vertidos a la sangre produciendo su efecto en la misma célula, en las de su alrededor o bien, a través del sistema circulatorio, en otras células de órganos lejanos. Su función es ejercer un efecto de control sobre distintas células del organismo, de tal forma que cada hormona actúa sobre unos determinados tejidos de forma específica para mantener el correcto funcionamiento del organismo.

35 El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), es el tipo más común de neoplasia maligna en el páncreas. Además, es la cuarta causa principal de muerte relacionada con el cáncer

en los EE.UU. y numerosos países occidentales (American Cancer Society (2023). *Facts and Figures 2023*, page 4). Con una tasa de supervivencia a 5 años de apenas el 5 a 10% de los enfermos que reciben la atención médica estándar en el momento del diagnóstico, el PDAC se presenta como un cáncer extremadamente agresivo. La resección quirúrgica es el único tratamiento potencialmente curativo, pero debido al retraso en la detección, únicamente entre el 15 y el 20% de los pacientes son candidatos para una pancreatectomía.

Los tumores neuroendocrinos pancreáticos (PANNET) son el segundo tipo más común de neoplasia pancreática, que representan del 3 al 5% de todos los casos. En contraste con las bajas tasas de supervivencia a largo plazo observadas en los PDAC, los PANNET generalmente exhiben un pronóstico generalmente más favorable (Dasari A *et al.*, 2017. *Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States*. JAMA Oncology, 3(10); 1335).

Debido a que las implicaciones pronósticas y terapéuticas difieren dramáticamente entre ambos tipos de tumores (Kaltsas G *et al.*, 2017. *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Pre- and Perioperative Therapy in Patients with Neuroendocrine Tumors*. Neuroendocrinology 105(3); 245-254), el diagnóstico preciso y diferencial entre ambos tumores pancreáticos es extremadamente importante.

El diagnóstico por imagen juega un papel importante para distinguir PANNET de PDAC. PANNET a menudo presenta hipervascularización, mientras que PDAC muestra características hipovasculares y desmoplásicas (Lewis RB *et al.*, 2010. *Pancreatic Endocrine Tumors: Radiologic-Clinicopathologic Correlation*. RadioGraphics 30(6); 1445-1464). Por lo tanto, los médicos a menudo dependen de imágenes de resonancia magnética dinámica o tomografía computerizada para diferenciar la perfusión vascular entre estas dos neoplasias. Estos patrones pueden ser sensibles a factores como el tamaño del tumor, su diferenciación y el grado de necrosis, lo que plantea desafíos en la diferenciación entre ellos (Yu H *et al.*, 2020. *Differential Diagnosis of Nonhypervascular Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms From Pancreatic Ductal Adenocarcinomas, Based on Computed Tomography Radiological Features and Texture Analysis*. Academic Radiology 27(3); 332-341). Aunque la ecografía endoscópica (USE) ofrece mayor precisión que los otros métodos de imagen tradicionales, PANNET, quistes y cistoadenomas inflamatorios pueden mostrar características similares, lo que dificulta el diagnóstico.

Hoy en día, la adquisición de tejido guiada por ecografía endoscópica es el método de referencia para el diagnóstico de las lesiones pancreáticas sólidas. Sin embargo, cuando se trata de pequeñas lesiones pancreáticas, las posibilidades de diagnóstico certero disminuyen considerablemente (Kawasaki Y *et al.*, 2023. *Efficacy of endoscopic ultrasound-guided tissue acquisition for solid pancreatic lesions 20 mm or less in diameter suspected as neuroendocrine tumors or requiring differentiation*. Journal of Gastroenterology 58(7); 693-703). Además, PANNET representa un grupo morfológicamente heterogéneo de tumores que puede resultar difícil de diagnosticar con precisión para los citopatólogos en muestras de aspiración con aguja fina (Attaway CC *et al.*, 2022. *Diversity and pitfalls of pancreatic neuroendocrine tumors: A case series of cytologic-histologic correlation*. Human Pathology Reports 28; 300630).

Es necesario, por lo tanto, buscar otros procedimientos que permitan identificar y diferenciar con exactitud ambos tumores.

Los microARN (miARN o miRNAs) forman parte de una subfamilia de ARN no codificantes que regulan la expresión génica, bien degradando el ARNm o inhibiendo su traducción. A diferencia de otros biomarcadores que únicamente se encuentran en la sangre, los miRNAs pueden estudiarse en muestras de tejido, lo que permite un análisis más localizado y contextualizado, resultando beneficioso en el diagnóstico.

Las investigaciones recientes se han centrado cada vez más en explorar el papel de los miRNA en PDAC (Daoud AZ *et al.*, 2019. *MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators*. BMC Cancer 19(1)) y, en menor medida, en PANNET (Malczewska A *et al.*, 2018. *A Comprehensive Assessment of the Role of miRNAs as Biomarkers in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors*. Neuroendocrinology 107(1); 73-90), subrayando su potencial como biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

La presente invención proporciona una firma diagnóstica de miRNAs que permite identificar tumores neuroendocrinos y adenocarcinomas, como por ejemplo PDAC y PANNET. Esta firma y los procedimientos de diagnóstico en los que se pueda emplear permitirán un diagnóstico diferencial temprano de las neoplasias, especialmente de PDAC, mejorando el acceso de los enfermos a tratamientos específicos e incrementando, por lo tanto, las expectativas de éxito del tratamiento.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

En un primer aspecto, la invención se refiere a una firma que comprende los miRNAs miR-129-5p y/o miR-203a para uso en el diagnóstico *in vivo/ex vivo* de un tumor neuroendocrino o adenocarcinoma, donde la secuencia de miR-129-5p se corresponde con SEQ ID NO:1 y la secuencia de miR-203a se corresponde con SEQ ID NO:2.

10

Un segundo aspecto se refiere a un método para el diagnóstico *in vitro/ex vivo* de un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma que comprende la detección de los miRNAs miR-129-5p y/o miR-203a, donde la secuencia de miR-129-5p se corresponde con SEQ ID NO:1 y la secuencia de miR-203a se corresponde con SEQ ID NO:2.

15

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para identificar un sujeto que sufre de un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma, que comprende las siguientes etapas:

20

- a) seleccionar una muestra previamente obtenida de un paciente que se sospecha sufre un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma;
- b) determinar el perfil de expresión de al menos los miRNAs miR-129-5p y/o miR-203a;
- c) indicar que el paciente sufre un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma en función del resultado obtenido en la etapa b).

25

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende los reactivos necesarios para uso en la detección y medición de la expresión de al menos el miRNA miR-129 y/o el miRNA-203, donde la secuencia de miR-129-5p se corresponde con SEQ ID NO:1 y la secuencia de miR-203a-5p se corresponde con SEQ ID NO:2.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35

Para complementar la descripción y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la presente invención, se acompaña como parte integrante de la descripción, un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. t-SNE de muestras TCGA según su perfil de expresión de miRNA como se muestra en la aplicación *Morphing Projections*. Cada punto representa una muestra de tejido y el mapa los muestra agrupados por similitud en su perfil de miRNA. COAD: Adenocarcinoma de colon, STAD: Adenocarcinoma de estómago, PDAC: Adenocarcinoma de páncreas, PANNET: Neuroendocrino pancreático

Figura 2. Resumen de la segregación de datos para el análisis entre PANNET y PDAC. TCGA: Atlas del genoma del cáncer, PANNET: tumores neuroendocrinos de páncreas, PDAC: adenocarcinoma de páncreas, LR: regresión logística, miRNA: microRNA.

Figura 3. Gráficos de violín para el grupo seleccionado de seis miRNA en el conjunto de datos TCGA (**** $P < 0,0001$).

Figura 4. Gráficos de violín para el grupo seleccionado de seis miRNA en los conjuntos de datos GSE73367 y GSE163031 (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, n.c. $P > 0,01$)

Figura 5. Nivel de expresión normalizado de miR-129-5p y 203a en PANNET, PDAC y tejido pancreático normal combinados en los conjuntos de datos TCGA, GSE73367, GSE163031 y GSE4379 (**** $P < 0,0001$).

Figura 6. Nivel de expresión de los miRNA -129-5p (arriba) y -203a (abajo) en TCGA. PDAC (se denomina aquí PAAD siguiendo la nomenclatura TCGA). LIHC: carcinoma hepatocelular de hígado; SARC: sarcoma; ACC: carcinoma adrenocortical; CHOL: colangiocarcinoma; BLCA: Carcinoma Urotelial de Vejiga; BRCA: Carcinoma mamario invasivo; KIRC: Carcinoma renal de células claras de riñón; CESC: Carcinoma de células escamosas de cuello uterino y adenocarcinoma endocervical; COAD: Adenocarcinoma de colon; UCEC: Carcinoma Endometrial del Cuerpo Uterino; ESCA: Carcinoma de esófago; HNSC: Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; KICH: Carcinoma renal de células cromófobas; KIRP: Carcinoma papilar de riñón; LUAD: Adenocarcinoma de pulmón; LUSC: Carcinoma de células escamosas de pulmón; MESO: Mesotelioma; OV: cistodenoza seroso de ovario; STAD: Adenocarcinoma de estómago; PAAD: Adenocarcinoma de páncreas; PANNET: Tumor neuroendocrino pancreático; PCPG: feocromocitoma y paraganglioma.

Figura 7. Curva ROC (Característica Operativa del Receptor) de miRNA-129-5p, miRNA-203a y de una combinación de ambos para diferenciar entre PANNET y PDAC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención está definida por las reivindicaciones.

5

En un primer aspecto, la invención se refiere a una firma que comprende los miRNAs miR-129-5p y/o miR-203a, para uso en el diagnóstico de un tumor neuroendocrino o de un adenocarcinoma. La secuencia de miR-129 se corresponde con SEQ ID NO:1 y la secuencia de miR-203a se corresponde con SEQ ID NO:2. Cualquier experto en el sector
10 conoce que los términos microARN, miARN y miRNAs son equivalentes y lo habitual en el sector es usar el término en inglés, miRNA.

En una realización preferida, la firma consiste en los miRNAs miR-129-5p y miR-203a.

15 En otra realización preferida, la firma pronóstica adicionalmente comprende al menos un miRNA seleccionado entre miR-21-5p, miR-21-3p, miR-1180-3p y miR-323b-3p. La secuencia de miR-21-5p. se corresponde con SEQ ID NO:3, la secuencia de miR-21-3p se corresponde con SEQ ID NO: 4, la secuencia de miR-1180-3p se corresponde con SEQ ID NO: 5 y la secuencia de miR-323b-3p se corresponde con SEQ ID NO:6.

20

En otra realización preferida, el tumor neuroendocrino o el adenocarcinoma se selecciona entre feocromocitoma, paraganglioma, carcinoma adenocortical (o carcinoma de corteza adrenal), carcinoma de riñón, cáncer de ovario, adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y un tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET). En una realización más preferida, la firma
25 distingue un tumor seleccionado entre adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y un tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET).

La segunda realización de la presente invención se refiere a método para el diagnóstico *in vitro/ex vivo* de un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma que comprende la
30 detección de los miRNAs miR-129-5p y/o miR-203a, donde la secuencia de miR-129 se corresponde con SEQ ID NO:1 y la secuencia de miR-203a se corresponde con SEQ ID NO:2.

En una realización preferida, la firma consiste en los miRNAs miR-129-5p y miR-203a.

35

En otra realización preferida, el método adicionalmente comprende la detección de al menos un miRNA seleccionado entre miR-21-5p, miR-21-3p, miR-1180-3p y miR-323b-3p, donde la secuencia de miR-21-5p se corresponde con SEQ ID NO:3, la secuencia de miR-21-3p se corresponde con SEQ ID NO: 4, la secuencia de miR-1180-3p se corresponde con SEQ ID NO: 5 y la secuencia de miR-323b-3p se corresponde con SE ID NO:6.

En otra realización preferida, el tumor neuroendocrino o el adenocarcinoma se selecciona entre feocromocitoma, paraganglioma, carcinoma adrenocortical (o carcinomas de corteza adrenal), carcinoma de riñón, cáncer de ovario, adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET). En una realización más preferida, la firma distingue entre adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET).

Una tercera realización de la invención se refiere a un procedimiento para identificar un sujeto que sufre de un tumor neuroendocrino, que comprende las siguientes etapas:

- a) seleccionar una muestra previamente obtenida de un paciente se sospecha que sufre de un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma;
- b) determinar el perfil de expresión de al menos los miRNAs miR-129 y/o miR-203;
- c) indicar que el paciente sufre un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma en función del resultado obtenido en la etapa b).

En una realización preferida la muestra en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en: tejido parafinado, tejido fresco, tejido congelado, o un fluido biológico. En una realización más preferida, el fluido biológico es sangre.

En otra realización preferida, la determinación de la expresión de los miRNAs en la etapa b) se realiza mediante PCR, microarrays, secuenciación de nueva generación o técnicas basadas en hibridación a sondas. En una realización más preferida, la determinación de la expresión de los miRNAs es por PCR cuantitativa o digital.

En otra realización preferida, el tumor neuroendocrino o el adenocarcinoma se selecciona del grupo que consiste en feocromocitoma, paraganglioma, carcinoma adrenocortical (o carcinoma de corteza adrenal), carcinoma de riñón, cáncer de ovario, adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y un tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET). En una realización más preferida, el tumor se selecciona entre adenocarcinoma de páncreas y tumor neuroendocrino de páncreas.

En otra realización preferida, en la etapa b) se determina al menos un miRNA seleccionado entre miR-21-5p, miR-21-3p, miR-1180-3p y miR-323b-3p

- 5 Otra realización de la presente invención se refiere a un kit que comprende los reactivos necesarios para uso en la detección y medición de la expresión de al menos el miRNA miR-129-5p y/o miRNA-203a.

10 En una realización preferida, la secuencia de miR-129 se corresponde con SEQ ID NO:1 y la secuencia de miR-203 se corresponde con SEQ ID NO:2

En otra realización preferida, el kit adicionalmente comprende los reactivos necesarios para medir la expresión de al menos un miRNA seleccionado entre miR-21-5p, miR-21-3p, miR-1180-3p y miR-323b-3p. La secuencia de miR-21-5p. se corresponde con SEQ ID NO:3, la
15 secuencia de miR-21-3p se corresponde con SEQ ID NO: 4, la secuencia de miR-1180-3p se corresponde con SEQ ID NO: 5 y la secuencia de miR-323b-3p se corresponde con SEQ ID NO:6.

20 La presente invención proporciona una firma de miRNA capaz de distinguir claramente entre neoplasias de origen neuroendocrino y adenocarcinomas con gran precisión. Los miRNA identificados pueden ejercer un papel supresor de tumores u oncogénico dependiendo de sus genes diana específicos y el contexto celular.

25 **EJEMPLOS**

Materiales y métodos

Análisis exploratorio

30

El Atlas del genoma del cáncer (TCGA, *The Cancer Genome Atlas*) proporciona mediciones de expresión genética y otros datos de transcripción de 33 tipos de cáncer diferentes. En este estudio se consideraron datos de la expresión génica de cohortes de cáncer previamente identificadas como PDAC (en la base de datos se denomina PAAD).

35 De este conjunto, se verificó posteriormente que siete muestras estaban etiquetadas incorrectamente y, de hecho, eran PANNET. El resto del conjunto se seleccionó para incluir solo tumores primarios y evitar muestras que pudieran sesgar el análisis siguiendo las

recomendaciones de Peran *et al.* (Peran S *et al.*, 2018. *Curation of the pancreatic ductal adenocarcinoma subset of the cancer genome atlas is essential for accurate conclusions about survival-related molecular mechanisms*. *ClinicalCancer Research* 24(16); 3813–3819). Este proceso dio como resultado un conjunto seleccionado de 149 muestras.

5

Los datos se descargaron del portal Xenabrowser <https://xenabrowser.net/datapages/>. Para cada cohorte se fusionaron: (a) datos que contienen mediciones de expresión de ARN (genes) utilizando la plataforma de secuenciación de ARN Illumina HiSeq 2000 y la media normalizada por gen en todas las cohortes; y (b) datos con expresión RNAseq de cadena madura de miRNAs. La tabla resultante, que incluye los niveles de expresión de genes y miRNA en unidades de log2 (RPM+1) (RPM = lecturas por millón), se elaboró eliminando genes y miRNA con valores no válidos, y luego se fusionó con metadatos clínicos (descargables desde [https:// portal.gdc.cancer.gov](https://portal.gdc.cancer.gov)). Esto permitió el análisis de 294 miRNA.

15

Los datos clínicos recopilados en la base de datos TCGA se clasificaron de acuerdo con la clasificación WHO 2019 (Gill A *et al.*, 2019. *Tumors of the pancreas*. WHO classification of tumors: digestive system tumours, 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, pp. 295-376).

20

Para el análisis exploratorio de los datos TCGA, se utilizó *Morphing Projections* (Díaz I *et al.* 2021. *Morphing projections: a new visual technique for fast and interactive large-scale analysis of biomedical datasets*. *Bioinformatics*, 37(22); 1571-1580), una herramienta que permite explorar muestras combinando interactivamente visualizaciones t-SNE (*t-Stochastic Neighbor Embedding*, Van Der Maaten I and Hinton G, 2008. *Visualizing data using t-SNE*. *Journal of Machine Learning Research*, 9(11); 2579–2625) de los perfiles de expresión de genes o miRNA, con configuraciones espaciales a medida de los datos basados en sus parámetros clínicos. Gracias a la capacidad de obtener mapas personalizados basados en la información del usuario, la herramienta es muy eficaz para elegir grupos relevantes de muestras para el análisis genético diferencial.

30

Validación

Para validar los hallazgos, se emplearon conjuntos de datos públicos adicionales disponibles en la base de datos GEO (Edgar R *et al.*, 2002. *Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository*. *Nucleic Acids Research*,

35

30(1); 207-10) con los números de acceso GSE163031 (Álvarez LH *et al.*, 2020. *Clinical value of nine circulating miRNAs in prognosis and diagnosis of PDAC*. NCBI), GSE73367 (Sadanandam A *et al.*, 2015. *A cross species and multi-omics (including metabolomics) analysis in pancreatic neuroendocrine tumours (miRNA)*. NCBI) y GSE43796 (Park M *et al.*, 2014. *Characterization of gene expression and activated signaling pathways in solid-pseudopapillary neoplasm of pancreas*. *Modern Pathology*, 27(4); 580-593). Los datos de miRNA se sometieron a una normalización percentil en todos los datos y muestras disponibles. El procedimiento de normalización de percentiles convierte los valores de casos y controles en percentiles de la distribución del estudio, lo que permitió comparar datos normalizados entre estudios (Gibbons SM *et al.*, 2018. *Correcting for batch effects in case-control microbiome studies*. *PLOS Computational Biology Methods*, 14(4); e1006102).

Análisis estadístico

Se empleó regresión logística para identificar los miRNA que explican de manera más efectiva la distinción entre dos grupos seleccionados. Los miRNA con los coeficientes más altos fueron indicativos de su mayor influencia en la diferenciación de grupos. Teniendo en cuenta el tamaño de la muestra, estos análisis permitieron confirmar los resultados obtenidos en TCGA. Adicionalmente, se realizaron pruebas ANOVA para evaluar la significación estadística de la diferencia en los niveles de expresión de miRNA entre los dos grupos.

Se utilizó la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*, o Característica Operativa del Receptor) para evaluar el poder discriminatorio de cada miRNA identificado previamente para distinguir entre PDAC y PANNET. El área bajo la curva (AUC) (con un intervalo de confianza del 95 % - IC) se calculó como una medida común de precisión. Para abordar el desequilibrio en el número de muestras, se utilizó la puntuación F1, que se define como la media armónica de la precisión y la sensibilidad (Gunawardana A and Shani G, 2009. *A survey of accuracy evaluation metrics of recommendation tasks*. *Journal of Machine Learning Research*, 10; 2935-2962).

El análisis se realizó utilizando Python con las bibliotecas *Scikit-Learn versión 1.3.0* (Pedregosa F. *et al.*, 2011. *Scikit-learn: Machine Learning in Python*. *Journal of Machine Learning Research*, 12; 2825—2830) y *SciPy versión 1.10.1*. Las figuras 3 a 5 se crearon utilizando *Matplotlib versión 3.7.2* (Hunter JD, 2007. *Matplotlib: A 2D Graphics Environment*. *Computing in Science & Engineering*, 9(3); 90-95). El IC del 95 % del AUC se calculó

utilizando una implementación rápida del algoritmo de DeLong (Sun X and Xu W, 2014. *Fast implementation of DeLong's algorithm for comparing the areas under correlated receiver operating characteristic curves*. IEEE Signal Processing Letters, 21(11); 1389-1393).

5

Ejemplo 1. Expresión diferencial de miRNA en el conjunto de datos TCGA: análisis comparativo para distinguir PANNET de PDAC

La herramienta “*Morphing Projections*” (proyecciones morfológicas) permitió un examen exploratorio de la expresión de miRNA en todos los tumores de la base de datos TCGA. Como se muestra en la **Figura 1**, las muestras de PDAC se agruparon cerca de los adenocarcinomas de colon (COAD) y estómago (STAD), mientras que PANNET formó un grupo separado dentro del panorama general del transcriptoma del cáncer. Esto demuestra que PANNET tiene un patrón único de expresión de miRNA.

15

Para evitar sesgos en el análisis diferencial entre las diferentes poblaciones, los datos se dividieron en 5 grupos, cada uno de los cuales contenía al menos 3 de las 7 muestras PANNET: uno que incluía todas las muestras curadas, dos basados en el género (masculino o femenino), uno de raza blanca y otro de etnia no hispana ni latina. Se realizó una clasificación de dos niveles, seleccionando los 8 miRNA más significativos para clasificarlos dentro de cada grupo, y finalmente tomando los 6 miRNA más relevantes de todos los candidatos. Este proceso se detalla en la **Figura 2**.

20

Tabla 1: Listado de los 6 miRNAs identificados como más relevantes

miRNA	Secuencia
miR-203a	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG
miR-21-3p	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU
miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR- 129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
miR-1180-3p	UUUCCGGCUCGCGUGGGUGUGU
miR-323b-3p	CCCAAUACACGGUCGACCUCUU

25

El análisis de la expresión diferencial de los miRNA entre PDAC y PANNET condujo a la identificación de un conjunto de 6 miRNAs (**Figura 3**) que tenían los niveles más altos (miR-203a, miR-21-3p, miR-21-5p) o más bajos (miR- 129-5p, miR-1180-3p y miR-323b-3p) en PDAC en comparación con PANNET.

Ejemplo 2. Validación de miRNA para distinguir PANNET de PDAC

Se llevó a cabo un análisis de validación externo, utilizando los conjuntos de datos GSE163031 y GSE73367, confirmando la expresión diferencial de dos de los seis miRNA identificados inicialmente, miR-129-5p, con niveles altos, y miR-203a, con niveles bajos en PANNET. Estos resultados se muestran en la **Figura 4**.

Ejemplo 3. Niveles de expresión de miR-129 y miR-203 en PDAC, PANNET y tejido normal

Para obtener un conjunto de datos más completo y equilibrado y evaluar el poder de discriminación de los dos miRNA, se fusionaron las tres bases de datos (TCGA, GSE163031 y GSE73367). Además, dada la importancia de discernir si las variaciones en la expresión de miRNA surgen de un origen tisular distinto del tumor o de características patológicas inherentes dentro del propio tumor, se analizaron siete muestras de tejido pancreático normal.

Para ello se integraron los datos de un cuarto estudio, GSE43796, que no solo contribuyó con perfiles de expresión de miRNA para seis muestras de PANNET y seis muestras de PDAC, sino que también incluyó cinco muestras adicionales de tejido pancreático normal. La colección resultante, por tanto, incluyó 63 PANNET, 167 PDAC y 12 muestras normales. Los niveles de expresión comparativos de miR-129-5p y miR-203a en los tres tipos de muestras se muestran en la **Figura 5**. PANNET exhibe niveles elevados de miR-129-5p en comparación con muestras de tejido normal y PDAC. Por el contrario, los niveles de miR-203a son significativamente más altos en PDAC en comparación con el páncreas normal o PANNET.

Ejemplo 4. Nivel de expresión de miR-129 y miR-203 en varios tipos de cáncer

Para incidir en las implicaciones clínicas de los hallazgos mostrados en los ejemplos anteriores, se investigaron los niveles de expresión de miR-129 y miR-203 en otros cánceres incluidos en la base de datos TCGA.

El resultado del análisis se representa en la **Figura 6**. Se puede observar que PANNET es la neoplasia con los niveles de expresión más altos de miR-129-5p, seguida de cerca por

el feocromocitoma y el paraganglioma (PCPG), otro tipo de tumor neuroendocrino. Esto se alinea con la notable expresión elevada de miR-129 en tejidos nerviosos en comparación con otros tejidos humanos (Saarland University, 2022. *The human and mouse small noncoding RNA tissue atlas*. [Online]. <https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas2/>).

5

Un análisis similar para miR-203 reveló que los carcinomas originados en células que revisten los órganos, particularmente los que se originan en la vejiga, el cuello uterino, los pulmones, la cabeza y el cuello o el estómago, exhiben los niveles de expresión más altos de miR-203. Por el contrario, los carcinomas originados en células que no revisten los

10 órganos como el carcinoma adrenocortical, el PCPG, el cáncer renal, el mesotelioma o el sarcoma expresan niveles comparativamente más bajos de este microRNA. Teniendo en cuenta estos datos, no es inesperado que miR-203 demuestre una mayor expresión en PDAC, cáncer epitelial, en comparación con PANNET, cáncer no epitelial.

15 **Ejemplo 5. Diferenciación de alta precisión de PDAC de PANNET mediante miRNA**

Al analizar la curva ROC, encontramos que miR-129 y miR-203 exhibieron una alta precisión para distinguir PANNET de PDAC, con un área bajo la curva (AUC) de 0,91 (IC del 95%: 0,862-0,954, F1 -puntuación: 0,822) y 0,96 (IC del 95%: 0,926-0,997, puntuación

20 F1: 0,891) respectivamente. En particular, el rendimiento combinado de miR-129-5p y miR-203a mostró una mejora significativa, con un AUC de 0,98 (IC del 95 %: 0,955-1,0, puntuación F1: 0,926), como se muestra en la **Figura 7**.

Los datos aportados revelan diferentes patrones de expresión de miRNA tisular en PDAC en comparación con PANNET. En particular, se identificó una firma de dos miRNA, miR-129-5p y miR-203a, capaces de diferenciar PDAC de PANNET con un 98% de precisión. Debido a la variación sustancial en los patrones de expresión de miRNA en varios tipos de

25 cáncer, la utilización de perfiles de expresión de estos dos miRNA es prometedora como un valioso marcador de diagnóstico.

30

Los resultados anteriores se han obtenido por rigurosos procedimientos de análisis, proporcionando una firma de dos miRNA capaz de distinguir claramente entre estas neoplasias con una precisión excepcional. Los dos miRNA identificados tienen una importancia considerable en varios tipos de cáncer. Tanto miRNA-129-5p como 203a

35 pueden ejercer un papel supresor de tumores u oncogénico dependiendo de sus genes diana específicos y el contexto celular.

LISTADO DE SECUENCIAS

	SEQ ID NO: 1 miR- 129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
5	SEQ ID NO: 2 miR-203a	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG
	SEQ ID NO: 3 miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
	SEQ ID NO: 4 miR-21-3p	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU
	SEQ ID NO: 5 miR-1180-3p	UUUCCGGCUCGCGUGGGUGUGU
	SEQ ID NO: 6 miR-323b-3p	CCCAAUACACGGUCGACCUCUU

REIVINDICACIONES

- 5 1. Firma que comprende los miRNAs miR-129-5p y/o miR-203a para uso en el diagnóstico *in vivo/ex vivo* de un tumor neuroendocrino o adenocarcinoma, donde la secuencia de miR-129 se corresponde con SEQ ID NO:1 y la secuencia de miR-203a se corresponde con SEQ ID NO:2.
- 10 2. La firma para uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que adicionalmente comprende al menos un miRNA seleccionado entre miR-21-5p, miR-21-3p, miR-1180-3p y miR-323b-3p, donde la secuencia de miR-21-5p se corresponde con SEQ ID NO:3, la secuencia de miR-21-3p se corresponde con SEQ ID NO: 4, la secuencia de miR-1180-3p se corresponde con SEQ ID NO: 5 y la secuencia de miR-323b-3p se corresponde con SE ID NO:6.
- 15 3. La firma para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que el tumor neuroendocrino o el adenocarcinoma se selecciona entre feocromocitoma, paraganglioma, carcinoma adrenocortical (o carcinomas de corteza adrenal), carcinoma de riñón, cáncer de ovario, adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET).
- 20 4. La firma pronóstica para uso de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada por que la firma distingue entre adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET).
- 25 5. Método para el diagnóstico *in vitro/ex vivo* de un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma que comprende la detección de los miRNAs miR-129-5p y/o miR-203a, donde la secuencia de miR-129 se corresponde con SEQ ID NO:1 y la secuencia de miR-203a se corresponde con SEQ ID NO:2.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que adicionalmente comprende la detección de al menos un miRNA seleccionado entre miR-21-5p, miR-21-3p, miR-1180-3p y miR-323b-3p, donde la secuencia de miR-21-5p se corresponde con SEQ ID NO:3, la secuencia de miR-21-3p se corresponde con SEQ ID NO: 4, la secuencia de miR-1180-3p se corresponde con SEQ ID NO: 5 y la secuencia de miR-323b-3p se corresponde con SE ID NO:6.
- 35

7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, caracterizada por que el tumor neuroendocrino o el adenocarcinoma se selecciona entre feocromocitoma, paraganglioma, carcinoma adrenocortical (o carcinomas de corteza adrenal), carcinoma de riñón, cáncer de ovario, adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET).
5
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada por que la firma distingue entre adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET).
10
9. Procedimiento para identificar un sujeto que sufre de un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma que comprende las siguientes etapas:
a) seleccionar una muestra previamente obtenida de un paciente que se sospecha sufre de un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma;
15 b) determinar el perfil de expresión de al menos los miRNAs miR-129-5p y/o miR-203a;
c) indicar que el paciente sufre un tumor neuroendocrino o un adenocarcinoma en función del resultado obtenido en la etapa b).
- 20 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado por que la muestra en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en: tejido parafinado, tejido fresco, tejido congelado, o un fluido biológico.
- 25 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado por que el fluido biológico es sangre.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que la determinación de la expresión de los miRNAs en la etapa b) se realiza mediante PCR, microarrays, secuenciación de nueva generación o técnicas basadas en hibridación a sondas.
30
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por que la determinación de la expresión de los miRNAs es por PCR cuantitativa o digital.
- 35 14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado por que el tumor neuroendocrino o el adenocarcinoma se selecciona del grupo que consiste en feocromocitoma, paraganglioma, carcinoma adrenocortical

(o carcinoma de corteza adrenal), carcinoma de riñón, cáncer de ovario, adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET).

- 5 15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado por que el tumor se selecciona entre adenocarcinoma de páncreas (PDAC) y tumor neuroendocrino de páncreas (PANNET).
- 10 16. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, caracterizado por que en la etapa b) además se determina al menos un miRNA seleccionado entre miR-21-5p, miR-21-3p, miR-1180-3p y/o miR-323b-3p.
- 15 17. Kit que comprende los reactivos necesarios para la detección y medición de la expresión de al menos el miRNAs miR-129 -5p y/o miRNA-203a, donde la secuencia de miR-129-5p se corresponde con SEQ ID NO:1 y la secuencia de miR-203a-5p se corresponde con SEQ ID NO:2
- 20 18. El kit de la reivindicación 17 caracterizado por que adicionalmente comprende los reactivos necesarios para medir la expresión de al menos un miRNA seleccionado entre miR-21-5p, miR-21-3p, miR-1180-3p y miR-323b-3p, donde la secuencia de miR-21-5p. se corresponde con SEQ ID NO:3, la secuencia de miR-21-3p se corresponde con SEQ ID NO: 4, la secuencia de miR-1180-3p se corresponde con SEQ ID NO: 5 y la secuencia de miR-323b-3p se corresponde con SEQ ID NO:6.

FIG. 1

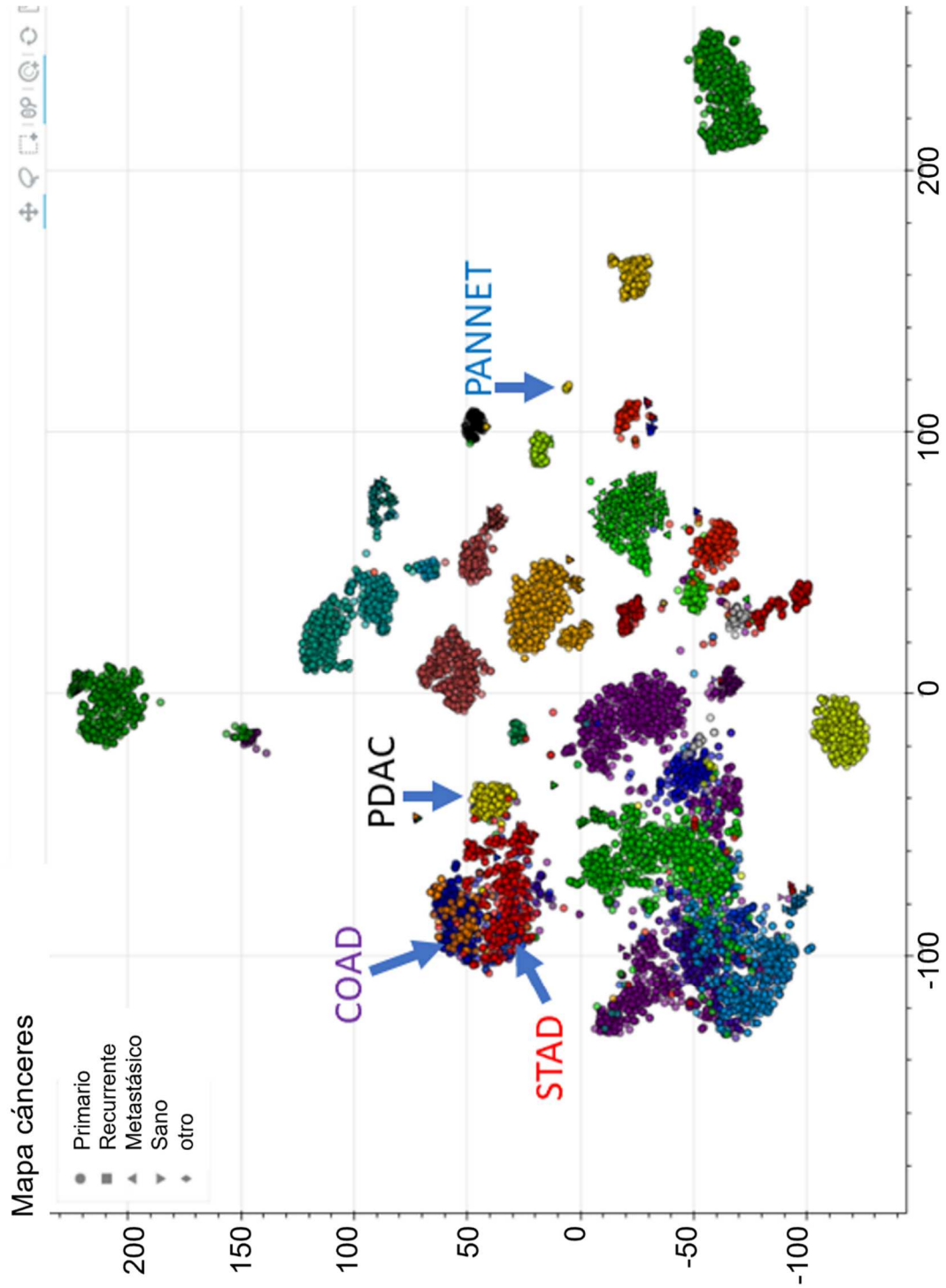


FIG. 2

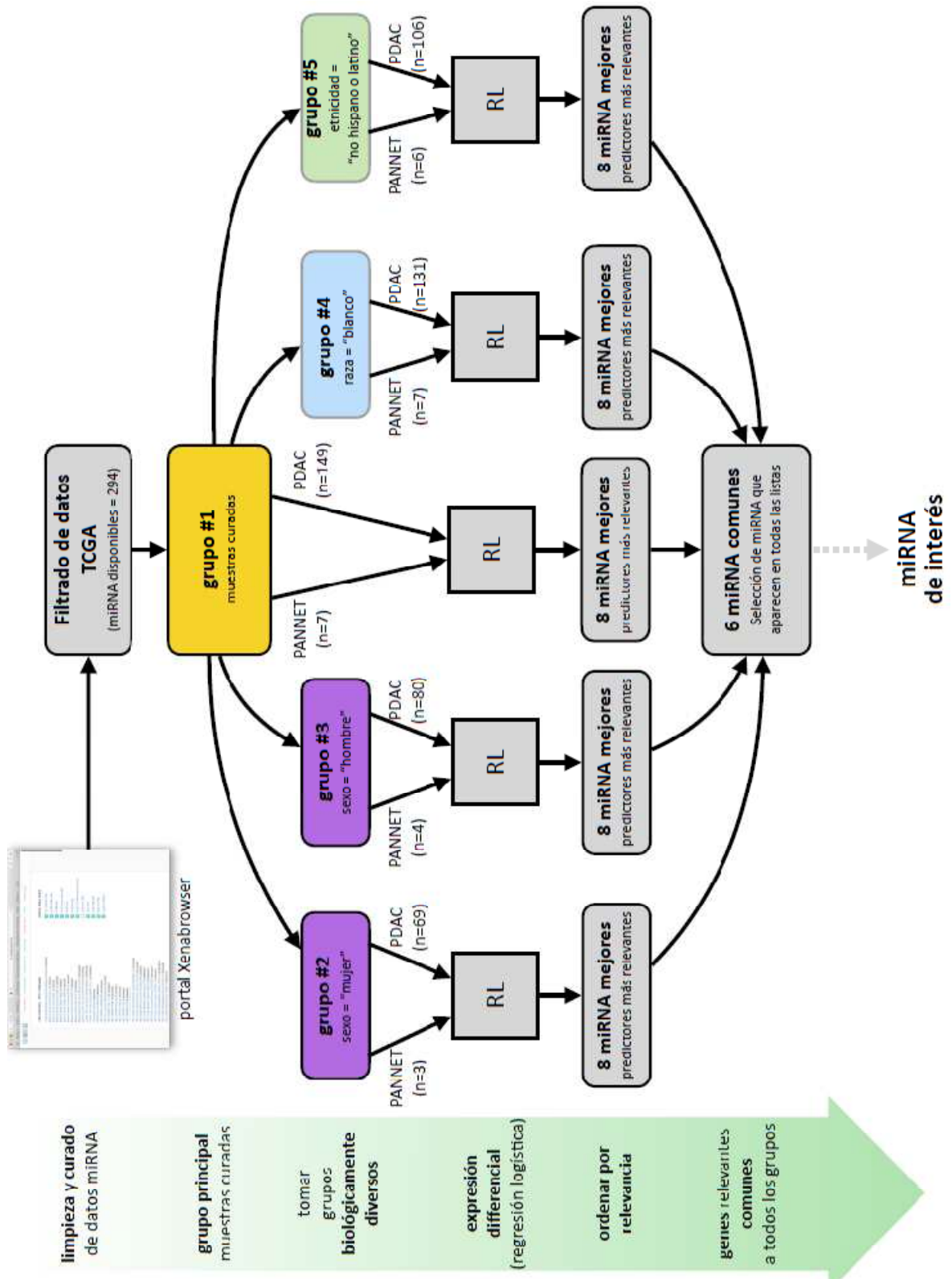


FIG. 3

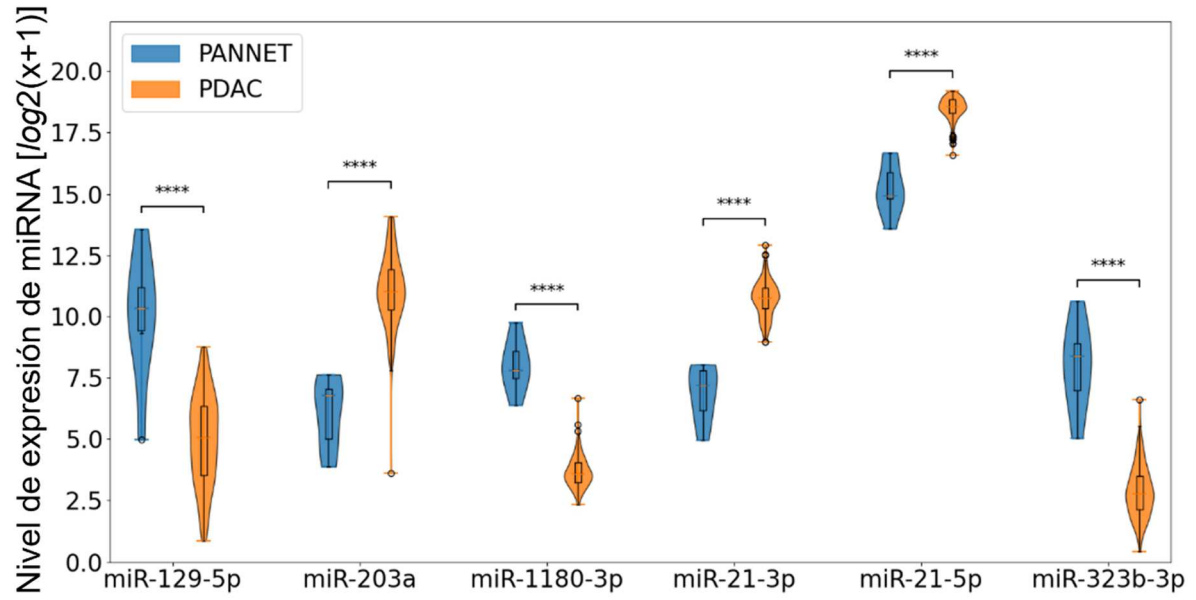


FIG. 4

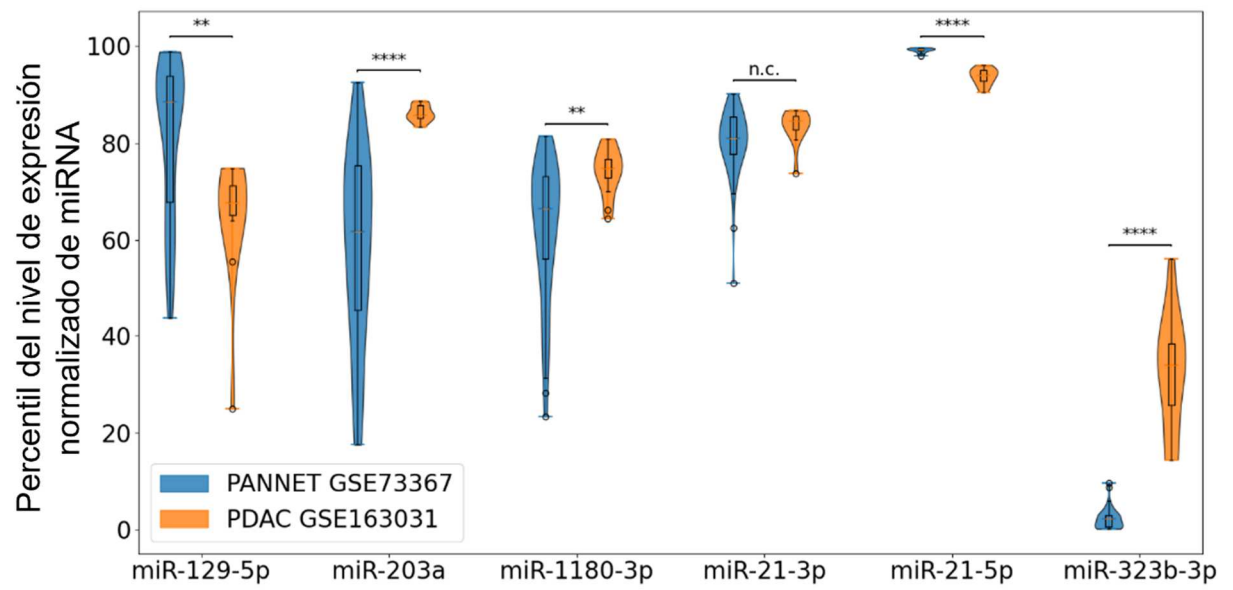


FIG. 5

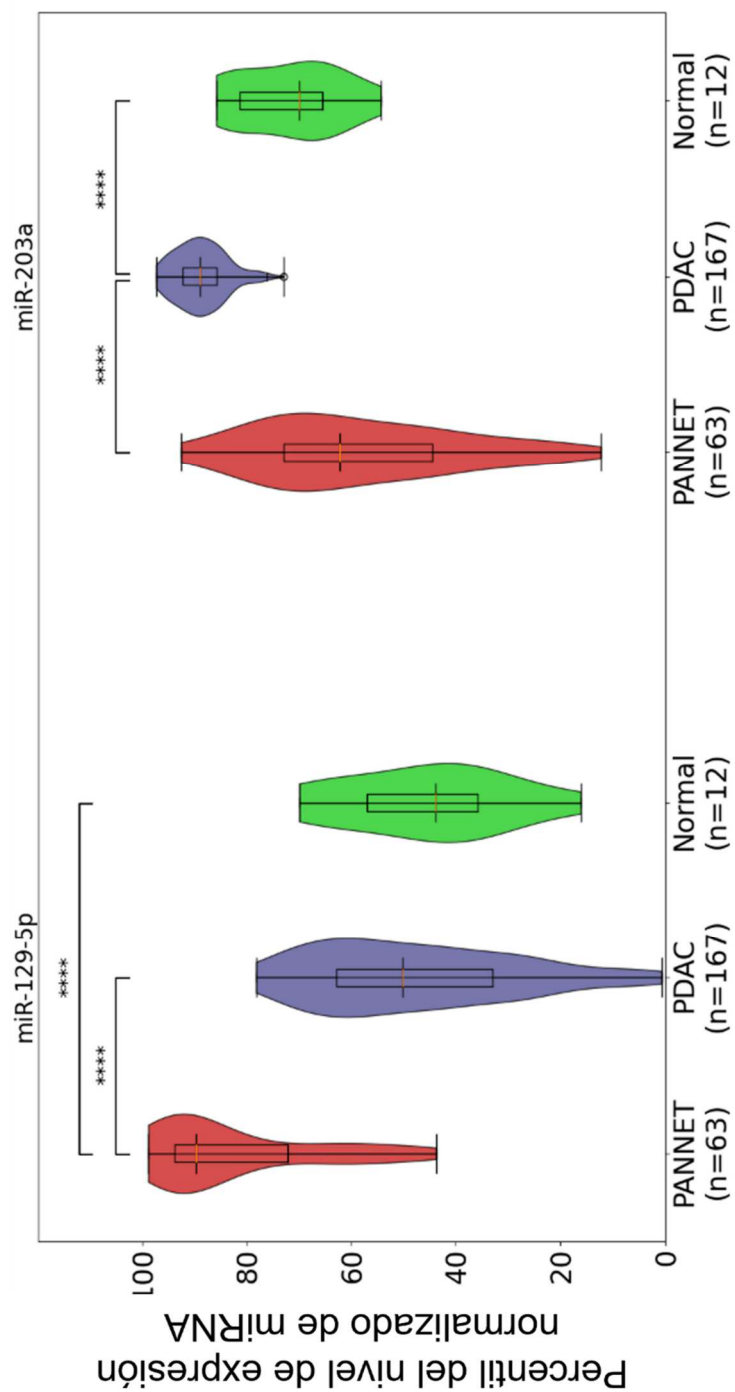


FIG. 6

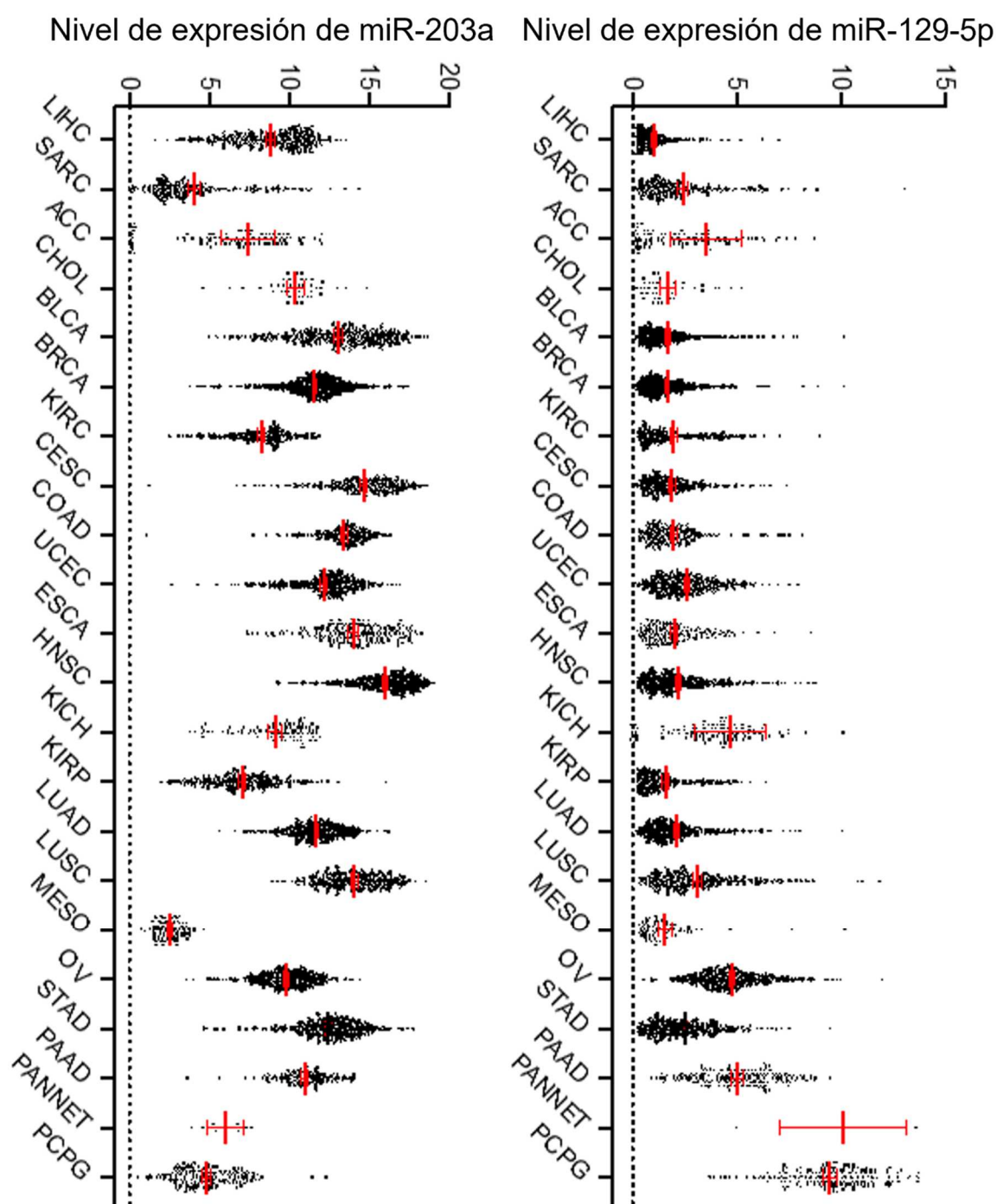
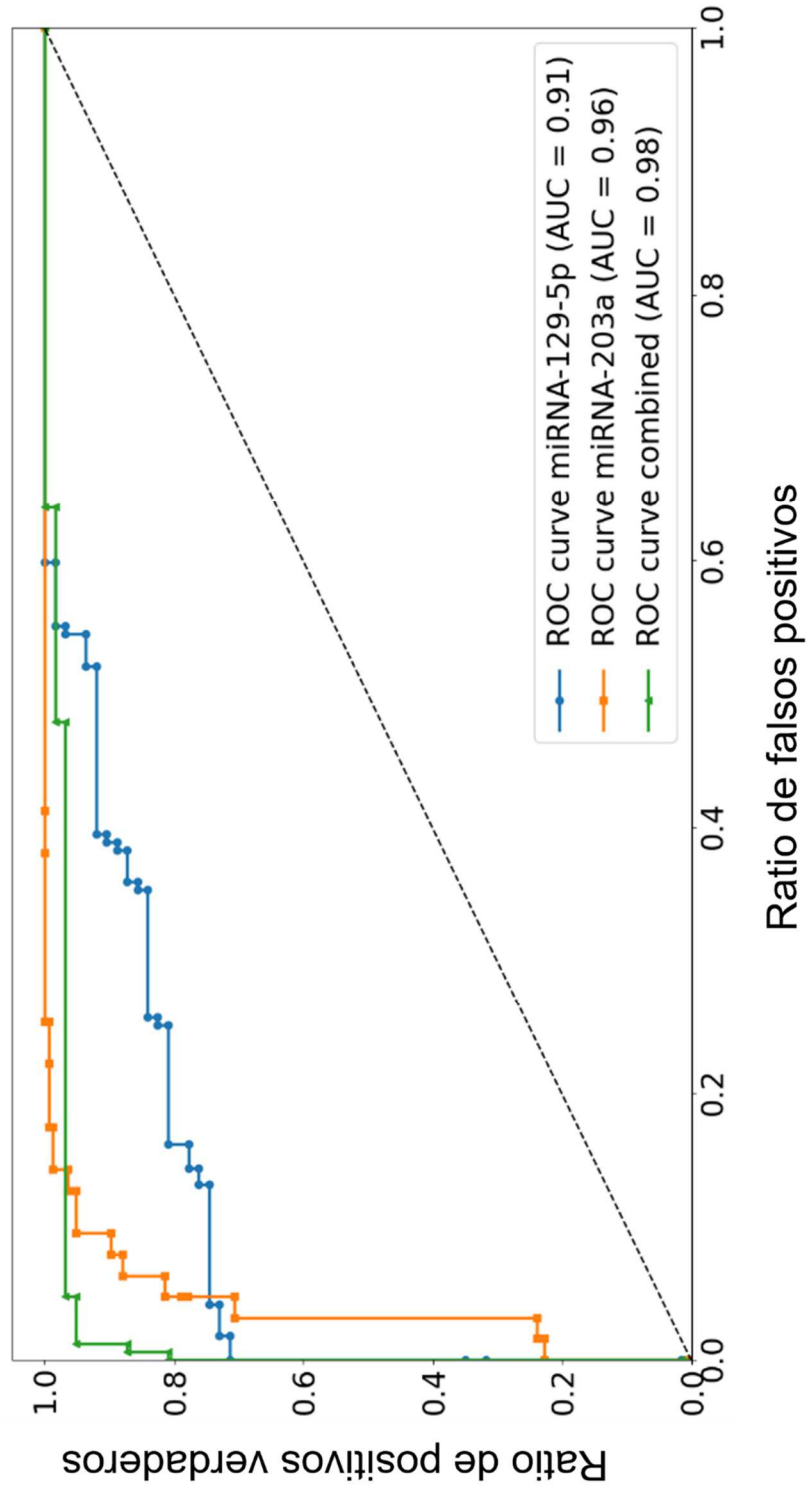


FIG. 7





- 21 N.º solicitud: 202430472
22 Fecha de presentación de la solicitud: 10.06.2024
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: C12Q1/6883 (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2007081680 A2 (UNIV OHIO STATE RES FOUND et al.) 19/07/2007, página 3, línea 28 - página 4, línea 18; página 5, líneas 7-12; página 6, líneas 6-27; tablas 3 y 5; reivindicaciones 1-3, 10, 16-21	1-18
X	ROLDO, C. et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. Journal of Clinical Oncology. 10/10/2006, Vol. 24, Nº 29, Páginas 4677-4684, <DOI: 10.1200/JCO.2005.05.5194>. resultados, tablas suplementarias 2 y 4; conclusiones.	1-18
X	WO 2007103808 A2 (UNIV OHIO STATE et al.) 13/09/2007, párrafos [0008], [0009], [0016], [0018], [0041] y [0102]; figura 10; reivindicaciones 1, 2, 4, 5 y 37.	1-8, 17, 18
X	WO 2007081740 A2 (UNIV OHIO STATE RES FOUND et al.) 19/07/2007, página 4, líneas 20-28; página 6, líneas 4-16; tabla 11; reivindicaciones 1, 9 y 10	1-8, 17, 18
A	CAPUTO, C. et al. Identification of tissue miRNA signatures for pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancers. 18/02/2024, Vol. 16, Nº 4, artículo nº 824, ISSN 2072-6694 (electronic), <DOI: 10.3390/cancers16040824>. todo el documento.	1-18
A	GOTO, T. et al. An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, - 21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker. BMC Cancer. 31/01/2018, Vol. 18, Nº 1, artículo nº 116. ISSN 1471-2407 (electronic), <DOI: 10.1186/s12885-018-4006-5>. todo el documento.	1-18
A	VILA-NAVARRO, E. et al. Novel circulating mirna signatures for early detection of pancreatic neoplasia. Clinical and Translational Gastroenterology. 30/04/2019, Vol. 10, Nº 4, artículo nº: e00029. ISSN 2155-384X, <DOI: 10.14309/ctg.0000000000000029>. todo el documento.	1-18
A	IKENAGA, N. et al. MicroRNA-203 Expression as a new prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma. Annals of Surgical Oncology. 22/07/2010, Vol. 17, Nº 12, Páginas 3120-3128, ISSN 1068-9265 (print), ISSN 1534-4681 (electronic), <DOI: 10.1245/s10434-010-1188-8>. todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica	O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud
--	--

El presente informe ha sido realizado		
<input type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones	<input checked="" type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº: (1-18) (en parte)	

Fecha de realización del informe 12.05.2025	Examinador J. L. Vizán Arroyo	Página 1/2
--	----------------------------------	---------------

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

C12Q

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

INVENES, AbS Patentes, Espacenet, Google Patents, Patentscope , AbS LNP, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI