

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 005 085**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2020** **E 23164521 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024** **EP 4223886**

54 Título: **Composiciones y métodos para la estabilización de micro-ARN**

30 Prioridad:

16.04.2019 EP 19305496

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2025

73 Titular/es:

GENFIT (100.00%)
885 avenue Eugène Avinée
59120 Loos, FR

72 Inventor/es:

MAJD, ZOUHER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 005 085 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

Composiciones y métodos para la estabilización de micro-ARN

5 La presente invención se refiere a la estabilización de moléculas de micro-ARN (miARN). Las composiciones y métodos descritos aquí se pueden utilizar de forma ventajosa para el suministro de microARN patrones para su inclusión en kits, útiles para la cuantificación relativa o absoluta de un miARN en un fluido biológico.

10 Los miARN circulantes ofrecen muchas características que los convierten en una clase atractiva de biomarcadores. Son estables, sus secuencias se conservan evolutivamente, la expresión de miARN a menudo es específica del tejido o de la patología, y debido a que pueden detectarse mediante PCR en tiempo real, los ensayos pueden ser altamente sensibles y específicos. Sin embargo, también existen desafíos asociados con la detección de miARN circulantes que aún deben abordarse. Uno de los desafíos se refiere a la baja cantidad de ARN total en la sangre, lo que dificulta medir la concentración y la calidad del ARN aislado. Como consecuencia, es de crucial importancia i) tener controles positivos calibrados y precisos de los miARN de interés, y ii) normalizar con precisión los valores de miARN detectados para las variaciones basadas en la cantidad de material de partida y la extracción de miARN. Se ha intentado la normalización buscando un ARN circulante "constitutivo". Algunos informes utilizan U6 u otros miARN (por ejemplo, miR-16) como ARN constitutivo. Sin embargo, los niveles de estos ARN a menudo cambian en condiciones patológicas. Otros han informado sobre un enfoque de normalización en el que se añadieron 3 miARN sintéticos de *Caenorhabditis elegans* (sin homología con los miARN humanos) durante el procedimiento de purificación, y se usaron para la normalización de datos. Sin embargo, mientras que los miARN son relativamente estables en fluidos biológicos, estando asociados a proteínas y lípidos y empaquetados en macrovesículas, los miARN sintéticos son fácilmente hidrolizados por las ARNasas y por lo tanto son difíciles de manipular o usar. Esto es una preocupación importante debido a que un enfoque de adición debe utilizar un patrón de miARN de concentración conocida, un requisito para la cuantificación absoluta o relativa de un nivel de miARN a partir de un fluido biológico.

25 El documento WO 2013/148151 describe que los miARN sintetizados se mezclan con LipoFectamine antes de añadirlos al plasma para protegerlos de la degradación. Guo ze et al. (Journal of Dermatological Science 2013 vol 69 p68-76) describen el uso de lipofectamine como agente lipofectante para transfectar células con miARN.

30 La presente invención proporciona composiciones y métodos que resuelven este problema.

Los inventores muestran aquí que los miARN sintéticos se pueden introducir de forma ventajosa en kits útiles para el diagnóstico, pronóstico o monitorización de una enfermedad cuando se combinan con un vector lipídico.

35 En consecuencia, un primer aspecto de la invención se refiere a un kit de diagnóstico que comprende más de un recipiente que comprende un miARN sintético y un vector lipídico, en el que dicho miARN sintético está en una concentración definida, en el que el vector lipídico se selecciona de lípidos conjugados con PEG.

40 En un aspecto particular, la invención se refiere a un kit de diagnóstico que comprende más de un recipiente que comprende un miARN sintético, un vector lipídico y una matriz (por ejemplo suero sintético, plasma desprovisto de ácido nucleico, muestra derivada de sangre), en el que dicho miARN sintético está en una concentración definida.

45 El kit comprende:

- uno o más recipientes que comprenden un primer miARN sintético; y
- uno o más recipientes que comprenden un segundo miARN sintético diferente del primer miARN.

50 Por ejemplo, el kit puede comprender:

- un primer conjunto de recipientes que contienen un primer miARN sintético, en el que dicho primer miARN sintético está en una concentración diferente en cada recipiente del primer conjunto de recipientes; y
- un segundo conjunto de recipientes que contienen un segundo miARN sintético, en el que dicho segundo miARN sintético se encuentra en una concentración diferente en cada recipiente del segundo conjunto de recipientes.

60 El kit puede comprender además al menos otro recipiente o al menos otro conjunto de recipientes que comprenden un miARN sintético adicional (por ejemplo, un tercer o más de un tercer miARN sintético). El miARN sintético adicional puede ser diferente del primer miARN sintético, del segundo miARN sintético y de cualquier otro miARN de orden inferior incluido en el kit. Por ejemplo, en el caso de un tercer miARN sintético, dicho tercer miARN sintético es diferente del primer miARN sintético y del segundo miARN sintético. En la realización que comprende otro conjunto de recipientes, el miARN sintético adicional (por ejemplo, el tercer miARN sintético) puede estar en una concentración diferente en cada recipiente del (por ejemplo, el tercer) conjunto adicional de recipientes.

65

El o los miARN sintéticos incluidos en el kit de la invención pueden ser cualquier miARN sintético que pueda utilizarse para control de calidad o para control interno, valor diagnóstico, pronóstico o de monitorización. Por ejemplo, el miARN sintético incluido en el kit puede tener la secuencia de un miARN cuyo nivel, ausencia o presencia en un fluido biológico está correlacionado con una enfermedad o etapa de una enfermedad, o está potencialmente correlacionado con una enfermedad o etapa de una enfermedad, o está correlacionado con una enfermedad potencial o etapa de una enfermedad potencial. Las enfermedades ilustrativas cuyo diagnóstico puede comprender la evaluación del nivel, presencia o ausencia de al menos un miARN incluyen, sin limitación, esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD), NASH, cánceres, fibrosis, infecciones virales, trastornos del sistema nervioso, trastornos cardiovasculares y diabetes.

En una realización particular, el o los miARN sintéticos son un miARN cuyo nivel, ausencia o presencia está asociado con NAFLD, NASH o fibrosis, en particular con NASH con fibrosis.

En una realización particular, al menos uno de los más de un recipiente o recipientes comprende hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-452 (más particularmente hsa-miR-452-5p) o hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p).

En una realización particular adicional, al menos uno de los más de un recipiente o recipientes comprende hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p). En otra realización más, el kit comprende un conjunto de recipientes, cada uno de los cuales comprende hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en una concentración diferente. En una variante particular, dicho kit comprende uno, al menos dos o al menos tres recipientes que comprenden cada uno hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en una concentración diferente. En otra variante particular, dicho kit comprende uno, dos o tres recipientes que comprenden cada uno hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en una concentración diferente. Una variante adicional se refiere a un kit que comprende un recipiente que comprende hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en una concentración definida. Otra variante se refiere a un kit que comprende dos recipientes que comprenden hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en una concentración definida, en el que la concentración de hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en el primer recipiente es diferente de la concentración de hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en el segundo recipiente. En otra variante adicional, el kit comprende tres recipientes que comprenden hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en una concentración definida, en el que la concentración de hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en el primer recipiente es diferente de la concentración de hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en el segundo recipiente, y en el que la concentración de hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en el tercer recipiente es diferente de la concentración de hsa-miR-34a sintético (más particularmente hsa-miR-34a-5p) en el primer recipiente y en el segundo recipiente.

En una realización particular adicional, al menos uno de los más de un recipiente o recipientes comprende hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p). En aún otra realización, el kit comprende un conjunto de recipientes que comprenden cada uno hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en una concentración diferente. En una variante particular, dicho kit comprende uno, al menos dos o al menos tres recipientes que comprenden cada uno hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en una concentración diferente. Una variante adicional se refiere a un kit que comprende un recipiente que comprende hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en una concentración definida. Otra variante se refiere a un kit que comprende dos recipientes que comprenden hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en una concentración definida, en el que la concentración de hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en el primer recipiente es diferente de la concentración de hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en el segundo recipiente. En aún una variante adicional, el kit comprende tres recipientes que comprenden hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en una concentración definida, en el que la concentración de hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en el primer recipiente es diferente de la concentración de hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en el segundo recipiente, y en el que la concentración de hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en el tercer recipiente es diferente de la concentración de hsa-miR-193 sintético (más particularmente hsa-miR-193b-3p) en el primer recipiente y en el segundo recipiente.

En una realización particular, al menos uno de los más de un recipiente o recipientes comprende cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p). En aún otra realización, el kit comprende un conjunto de recipientes que comprenden cada uno cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en una concentración diferente. En una variante particular, dicho kit comprende uno, al menos dos o al menos tres recipientes que comprenden cada uno cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en una concentración diferente. En otra variante particular, dicho kit comprende uno, dos o tres recipientes que comprenden cada uno cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en una concentración diferente. Una variante adicional se refiere a un kit que comprende un recipiente que comprende cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en una concentración definida. Otra variante se refiere a un kit que comprende dos recipientes que comprenden cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en una concentración definida, en el que la concentración de cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en el primer recipiente es diferente de la concentración de cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en el segundo recipiente.

miR-39-3p) en el segundo recipiente. En aún un variante adicional, el kit comprende tres recipientes que comprenden cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en una concentración definida, en el que la concentración de cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en el primer recipiente es diferente de la concentración de cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en el segundo recipiente, y en el que la concentración de cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en el tercer recipiente es diferente de la concentración de cel-miR-39 sintético (más particularmente cel-miR-39-3p) en el primer recipiente y en el segundo recipiente.

En otra realización particular, al menos uno de los más de un recipiente o recipientes comprende cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p). En aún otra realización, el kit comprende un conjunto de recipientes que comprenden cada uno cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en una concentración diferente. En una variante particular, dicho kit comprende uno, al menos dos o al menos tres recipientes que comprenden cada uno cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en una concentración diferente. En otra variante particular, dicho kit comprende uno, dos o tres recipientes que comprenden cada uno cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en una concentración diferente. Una variante adicional se refiere a un kit que comprende un recipiente que comprende cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en una concentración definida. Otra variante se refiere a un kit que comprende dos recipientes que comprenden cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en una concentración definida, en el que la concentración de cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en el primer recipiente es diferente de la concentración de cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en el segundo recipiente. En aún un variante adicional, el kit comprende tres recipientes que comprenden cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en una concentración definida, en el que la concentración de cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en el primer recipiente es diferente de la concentración de cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en el segundo recipiente, y en el que la concentración de cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en el tercer recipiente es diferente de la concentración de cel-miR-40 sintético (más particularmente cel-miR-40-3p) en el primer recipiente y en el segundo recipiente.

En una realización particular adicional, al menos uno de los más de un recipiente o recipientes comprende ath-miR-159a, cel-lin-4, cel-miR-2, cel-miR-238, cel-miR-54 o cel-miR-55, más particularmente ath-miR-1549a, cel-lin4-5p, cel-miR2-3p, cel-miR-238-3p, cel-miR-54-3p o cel-miR-55-3p sintéticos respectivamente.

El o los recipientes del kit de la descripción comprenden un complejo de un miARN y de un vector lipídico. Los vectores lipídicos ilustrativos pueden comprender, sin limitación, lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos (tales como lípidos neutros o aniónicos), y lípidos conjugados, tales como lípidos conjugados con aminoácidos, lípidos conjugados con péptidos, o lípidos conjugados con PEG. En una realización, los vectores lipídicos para la práctica de la invención comprenden lípidos no catiónicos (tales como lípidos neutros o aniónicos) y lípidos conjugados con PEG. En una realización particular, el vector lipídico comprende al menos un lípido catiónico. En una realización particular adicional, el al menos un lípido catiónico se mezcla con al menos un lípido neutro y/o con al menos un lípido conjugado. En una realización particular adicional, un lípido catiónico se puede mezclar con PEG, tal como C12-C20, en particular C14-C18, PEG con un peso molecular de 500 - 7500.

El vector lipídico para la práctica de la invención se selecciona de lípidos conjugados con PEG. En una realización particular, el vector lipídico es un glicerofosfolípido conjugado con PEG. En aún otra realización, el vector lipídico es una monoglicerofosfoetanolamina conjugada con PEG o una diacilglicerofosfoetanolamina conjugada con PEG, o una sal de la misma. En una realización adicional, el vector lipídico es una diacilglicerofosfoetanolamina conjugada con PEG, o una sal de la misma. En otra realización particular, el vector lipídico es una diacil(C₁₄-C₁₈)glicerofosfoetanolamina conjugada con PEG, o una sal de la misma, tal como una diacilC₁₈glicerofosfoetanolamina conjugada con PEG, o una sal de la misma. En cada una de las realizaciones descritas en el presente párrafo, el resto de PEG puede ser un PEG que tiene un peso molecular de 500 a 7500, en particular de 750 a 5000, tal como de 1000 a 4000. En una realización particular, el resto de PEG de los vectores lipídicos descritos en el presente párrafo puede ser de 1000, 2000, 3000 o 4000, en particular 2000. En una realización particular adicional, el vector lipídico es 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (C16 PEG2000 PE), o una sal de la misma, tal como su sal de amonio.

En una realización particular, el lípido catiónico es un lípido catiónico monovalente o polivalente. Entre los lípidos catiónicos monovalentes, se pueden citar, sin limitación, DOTMA, DOTAP, DMRIE, y DDAB. Los lípidos catiónicos polivalentes ilustrativos incluyen, sin limitación, DOSPA, DOSPER, DOGS, TMTPS, TMTOS, TMTLS, TMTMS, y TMDOS. Entre los lípidos neutros se pueden citar, sin limitación, DOPE, DPhPE, y colesterol.

Por ejemplo, los vectores lipídicos ilustrativos incluyen, sin limitación, los descritos en los documentos WO9405624, WO9427435, WO9502698, WO9517373, WO9640961, US8058068, WO9840502, US20060229246, US20030069173, WO200027795, WO200234879, WO2006102163, WO201268176, WO201611203 y US20190060482.

En una realización particular de la descripción, el vector lipídico se selecciona de:

2,3-dioleiloxi-1-(N,N-dimetilamino)propano;

2H-Isoindol-2-etanaminio, N-[2,3-bis(9-octadeceniloxy)propil]-1,3-dihidro-N,N-dimetil-1,3-dioxo-, bromuro;

1-Propanaminio. N-(2-amino)etil-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxy)-bromuro; 3-Oxa-5,9,15-triazaheptadecan-17-amino, N-[2,3-bis(9-octadeceniloxy)propil]-9-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-13-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil][3-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]aminopropil]amino-N,N,2,2-tetrametil-4,14-dioxo-, bromuro;

1-Propanaminio. N-[2-[[2,5-bis[(3-aminopropil)amino]-1-oxo-pentil]amino]etil]-n,n-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxy)-, sal de tetra(trifluoroacetato)

1-Propanaminio, N-[2-(2-bromo)etil]-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxy)-, bromuro; 1-Propanaminio, N-{2-[[3-[[4-(3-aminopropil)amino]butil]amino]propil]amino]etil}-n,n-dimetil-2,3-bis-(9-octadeceniloxy)-, bromuro; y

1-Propanaminio, N-[2-[(3-aminopropil)amino]etil]-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxy)-, bromuro.

En una realización particular de la descripción, el vector lipídico se selecciona de:

N,N,N',N'-tetrapalmitolespermina, mezclada o no con DOPE;

N,N,N',N'-tetrapalmilespermina, mezclada o no con DOPE;

yoduro de N,N,N',N'-tetrametiltetrapalmilesperminatetramonio, mezclado o no con DOPE;

yoduro de N,N,N',N'-hexametiltetrapalmilesperminatetramonio;

DOTMA:DOPE (en particular 1:1 (p/p)) y

DOSPA:DOPE (en particular 1,5:1 (p/p));

En una realización particular de la descripción, el vector lipídico es yoduro de N,N,N',N'-tetrametiltetrapalmilesperminatetraamonio, más particularmente una mezcla 1:1 de yoduro de N,N,N',N'-tetrametiltetrapalmilesperminatetraamonio y DOPE;

En una realización particular, el vector basado en lípidos comprende trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxy-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio. En una realización adicional, trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxy-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio se mezcla con un lípido neutro tal como dioleilfosfatidiletanolamina.

En otra realización particular, el vector basado en lípidos comprende:

N¹,N⁴-dioleoil-diaminobutano

N¹,N⁴-dioleil-diaminobutano

N¹,N⁴-dioleil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-ftalamido)propil]-diamino-butano

N¹,N⁴-dioleil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)]-diaminobutano(DHDOS)

N¹,N⁴-dimiristil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)]-diaminobutano;

N¹,N⁴-dipalmitil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)]-diaminobutano;

N¹,N⁴-dipalmitoil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)]-diaminobutano;

N¹,N⁴-diestearil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)]-diaminobutano;

N¹,N⁴-dilaúril-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)]-diaminobutano;

N¹,N²-dimiristil-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)]-diaminoetano;

N¹,N²-dipalmitil-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)]-diaminoetano;

N¹,N²-dipalmitoil-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)]-diaminoetano;

N¹,N²-diestearil-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)]-diaminoetano;

N¹,N²-dilaúril-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)-diaminoetano];
 5 N¹,N²-dioleil-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)-diaminoetano];
 N¹,N⁹-dimiristil-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)-Jeffamina];
 N¹,N⁹-dipalmitil-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)-Jeffamina];
 10 N¹,N⁹-dipalmitoilil-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)-Jeffamina];
 N¹,N⁹-diestearil-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)-Jeffamina];
 15 N¹,N⁹-dilaúril-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)-Jeffamina];
 N¹,N⁹-dioleil-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-aminopropil)-Jeffamina]
 N¹,N⁴-dioleil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-carboxamidina)aminopropil]-diaminobutano;
 20 N¹,N⁴-dioleil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-[N-(N^I,N^{II},N^{III},N^{IV}-butoxicarbonil-esperminacarboxamido)aminopropil]diaminobutano;
 N¹,N⁴-dioleil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]-diaminobutano.
 25 N¹,N⁴-dimiristil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)aminopropil]-diaminobutano;
 N¹,N⁴-dipalmitil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]-diaminobutano;
 30 N¹,N⁴-dipalmitoilil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)aminopropil]-diaminobutano;
 N¹,N⁴-diestearil-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]-diaminobutano;
 N¹,N⁴-dilaúril-N¹,N⁴-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]diaminobutano;
 35 N¹,N⁹-dimiristil-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)aminopropil]-Jeffamina;
 N¹,N⁹-dipalmitil-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]-Jeffamina;
 40 N¹,N⁹-dipalmitoilil-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)aminopropil]-Jeffamina;
 N¹,N⁹-diestearil-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]-Jeffamina;
 N¹,N⁹-dilaúril-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]Jeffamina;
 45 N¹,N⁹-dioleil-N¹,N⁹-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]Jeffamina;
 N¹,N²-dimiristil-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]-diaminoetano;
 50 N¹,N²-dipalmitil-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)aminopropil]-diaminoetano;
 N¹,N²-dipalmitoilil-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]-diaminoetano;
 N¹,N²-diestearil-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]diaminoetano;
 55 N¹,N²-dilaúril-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]diaminoetano;
 N¹,N²-dioleil-N¹,N²-di-[2-hidroxi-3-(N-esperminacarboxamido)-aminopropil]-diaminoetano.

En una realización adicional, el vector basado en lípidos comprende:

60 N,N',N'',N''' tetrametiltetrapalmitilespermina (TMTPS-yoduro o TMTPS-cloruro);
 N,N',N'',N''' tetrametiltetrapalmitilespermina (TMTPS-yoduro) mezclada con DOPE (por ejemplo 1:1,5 (M/M)); una
 65 N,N',N'',N''' tetrametiltetrapalmitilespermina (TMTPS-yoduro) liposomal mezclada con DOPE (por ejemplo 1:1,5 (M/M)).

En otra realización, el vector basado en lípidos comprende un lípido que contiene amina, tal como:

2-[3-Metilaminopropil-(2-oxo-2-tetradecoxietil)amino]acetato de tetradecilo;

2-[2-[2-[2-bis[2-(Dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]etil-[2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]etilamino]etil-[2-(dodecilamino)-2-oxo-etil]amino]-N-dodecil-acetamida;

2-[2-[2-[2-bis[2-(Dodecilamino)-2-oxoetil]amino]etilamino]etilamino] etil-[2-(dodecilamino)-2-oxoetil]amino]-N-dodecil-acetamida;

4,4'-(3-(Metil(4-oxo-4-(pentadeciloxi)butil)amino)propilazanedil)dibutanoato de dipentadecilo; y 4-(Metil(3-(4-oxo-4-(pentadeciloxi)butilamino)propil)amino)butanoato de pentadecilo.

En una realización particular adicional, el vector lipídico comprende al menos uno de los compuestos 1 a 87 del documento WO2012068176. En una realización particular adicional, el vector lipídico comprende al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en:

Compuesto 1 del documento WO2012068176;

Compuesto 2 del documento WO2012068176;

Compuesto 3 del documento WO2012068176;

Compuesto 4 del documento WO2012068176;

Compuesto 5 del documento WO2012068176;

Compuesto 6 del documento WO2012068176;

Compuesto 7 del documento WO2012068176;

Compuesto 8 del documento WO2012068176;

Compuesto 9 del documento WO2012068176;

Compuesto 10 del documento WO2012068176;

Compuesto 11 del documento WO2012068176;

Compuesto 12 del documento WO2012068176;

Compuesto 13 del documento WO2012068176;

Compuesto 14 del documento WO2012068176;

Compuesto 15 del documento WO2012068176;

Compuesto 16 del documento WO2012068176;

Compuesto 17 del documento WO2012068176;

Compuesto 18 del documento WO2012068176;

Compuesto 19 del documento WO2012068176;

Compuesto 20 del documento WO2012068176;

Compuesto 21 del documento WO2012068176;

Compuesto 22 del documento WO2012068176;

Compuesto 23 del documento WO2012068176;

Compuesto 24 del documento WO2012068176;

Compuesto 25 del documento WO2012068176;

5 Compuesto 26 del documento WO2012068176;

Compuesto 27 del documento WO2012068176;

Compuesto 28 del documento WO2012068176;

10 Compuesto 29 del documento WO2012068176;

Compuesto 30 del documento WO2012068176;

15 Compuesto 31 del documento WO2012068176;

Compuesto 32 del documento WO2012068176;

Compuesto 33 del documento WO2012068176;

20 Compuesto 34 del documento WO2012068176;

Compuesto 35 del documento WO2012068176;

25 Compuesto 36 del documento WO2012068176;

Compuesto 37 del documento WO2012068176;

Compuesto 38 del documento WO2012068176;

30 Compuesto 39 del documento WO2012068176;

Compuesto 40 del documento WO2012068176;

35 Compuesto 41 del documento WO2012068176;

Compuesto 42 del documento WO2012068176;

Compuesto 43 del documento WO2012068176;

40 Compuesto 44 del documento WO2012068176;

Compuesto 45 del documento WO2012068176;

45 Compuesto 46 del documento WO2012068176;

Compuesto 47 del documento WO2012068176;

Compuesto 48 del documento WO2012068176;

50 Compuesto 49 del documento WO2012068176;

Compuesto 50 del documento WO2012068176;

55 Compuesto 51 del documento WO2012068176;

Compuesto 52 del documento WO2012068176;

Compuesto 53 del documento WO2012068176;

60 Compuesto 54 del documento WO2012068176;

Compuesto 55 del documento WO2012068176;

65 Compuesto 56 del documento WO2012068176;

Compuesto 57 del documento WO2012068176;
Compuesto 58 del documento WO2012068176;
5 Compuesto 59 del documento WO2012068176;
Compuesto 60 del documento WO2012068176;
10 Compuesto 61 del documento WO2012068176;
Compuesto 62 del documento WO2012068176;
Compuesto 63 del documento WO2012068176;
15 Compuesto 64 del documento WO2012068176;
Compuesto 65 del documento WO2012068176;
20 Compuesto 66 del documento WO2012068176;
Compuesto 67 del documento WO2012068176;
Compuesto 68 del documento WO2012068176;
25 Compuesto 69 del documento WO2012068176;
Compuesto 70 del documento WO2012068176;
30 Compuesto 71 del documento WO2012068176;
Compuesto 72 del documento WO2012068176;
Compuesto 73 del documento WO2012068176;
35 Compuesto 74 del documento WO2012068176;
Compuesto 75 del documento WO2012068176;
40 Compuesto 76 del documento WO2012068176;
Compuesto 77 del documento WO2012068176;
Compuesto 78 del documento WO2012068176;
45 Compuesto 79 del documento WO2012068176;
Compuesto 80 del documento WO2012068176;
50 Compuesto 81 del documento WO2012068176;
Compuesto 82 del documento WO2012068176;
Compuesto 83 del documento WO2012068176;
55 Compuesto 84 del documento WO2012068176;
Compuesto 85 del documento WO2012068176;
60 Compuesto 86 del documento WO2012068176;
Compuesto 87 del documento WO2012068176; y
sales de los mismos.

En otra realización específica, el vector lipídico puede ser una formulación lipídica como se describe en las tablas 1, 2 y 3 del documento WO2012068176, que se reproducen a continuación:

Tabla 1 del documento WO2012068176

Compuesto del documento WO2012068176	Lípido PEG	Lípido auxiliar	Amortiguador	Etanol, %	Concentración, mg/ml
49	C16 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
7	C16 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
69	C14 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
70	C14 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
51	C14 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
52	C14 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
54	C14 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
56	C16 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
57	C16 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
73	C16 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
76	C16 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625
77	C16 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 50 mM	25	15,625

5

Tabla 2 del documento WO2012068176:

Compuesto del documento WO2012068176	Lípido PEG	Lípido auxiliar	Amortiguador	Etanol, %	Concentración, mg/ml
IVF2.0	C16 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 139,5 mM	25	15,625
57 NO (CB00396)	C16 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 139,5 mM	25	15,625
57 OPT (CB00396)	C14 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 139,5 mM	25	15,625
72 OPT (CB00401)	C14 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 139,5 mM	25	15,625
84 NO (CB00416)	C14 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 139,5 mM	25	15,625
84 OPT (CB00416)	C14 PEG2000 PE	Colesterol	Acetato de sodio 139,5 mM	25	15,625
Compuesto del documento WO2012068176		Lípido auxiliar		Etanol, %	
83		Ninguno		100	
67		Colesterol		100	

En una realización particular adicional de la descripción, el vector lipídico es una mezcla de DHDMS, HDMS, DOPE y colesterol. En otra realización, el vector lipídico es una formulación lipídica como se describe en la tabla 1 del documento WO2016011203:

10

Tabla 1 del documento WO2016011203:

Formulación	DHDMS	HDMS	DOPE	Colesterol
1	0,1	0,1	0,4	0,4
2	0,1	0,25	0,25	0,4
3	0,1	0,25	0,4	0,25
4	0,1	0,4	0,1	0,4

Formulación	DHDMS	HDMS	DOPE	Colesterol
5	0,1	0,4	0,25	0,25
6	0,1	0,4	0,4	0,1
7	0,1	0,3	0,3	0,3
8	0,2	0,4	0,2	0,2
9	0,2	0,2	0,2	0,4
10	0,2	0,2	0,4	0,2
11	0,25	0,4	0,1	0,25
12	0,25	0,4	0,25	0,1
13	0,25	0,1	0,25	0,4
14	0,25	0,1	0,4	0,25
15	0,25	0,25	0,1	0,4
16	0,25	0,25	0,4	0,1
17	0,3	0,1	0,3	0,3
18	0,3	0,3	0,1	0,3
19	0,3	0,3	0,3	0,1
20	0,4	0,4	0,1	0,1
21	0,4	0,2	0,2	0,2
22	0,4	0,25	0,1	0,25
23	0,4	0,25	0,25	0,1
24	0,4	0,1	0,1	0,4
25	0,4	0,1	0,25	0,25
26	0,4	0,1	0,4	0,1

En una realización particular adicional, el vector lipídico comprende una formulación de nanopartículas lipídicas como se describe en el documento US20190060482, que comprende PEG de peso molecular 750, 2000 o 5000, con una longitud de cadena de 14 o 18, DHDMS, HDMS, DOPE, y colesterol. Más particularmente, la formulación es una de las formulaciones de la tabla 2 del documento US20190060482:

5

Formulación	Longitud de la cadena de PEG	Peso molecular de PEG	DHDMS	HDMS	DOPE	Colesterol	PEG
Bruce #3.10	14	5000	0,24	0,38	0,32	0,05	0,01
Bruce #3.14	14	5000	0,32	0,39	0,26	0,01	0,02
Bruce #3.20	14	5000	0,18	0,38	0,32	0,10	0,02
Bruce #3.19	14	5000	0,23	0,45	0,20	0,10	0,02
Bruce #3.11	14	5000	0,18	0,51	0,20	0,10	0,01
Bruce #3.15	14	5000	0,27	0,38	0,32	0,01	0,02
Bruce #3.12	14	5000	0,25	0,38	0,26	0,10	0,01
Bruce #2.2	18	750	0,28	0,24	0,32	0,14	0,02
Bruce #3.16	14	5000	0,18	0,47	0,32	0,01	0,02
Bruce #4	14	2000	0,24	0,40	0,24	0,10	0,02
Bruce #3.18	14	5000	0,32	0,38	0,20	0,08	0,02
Intervalos molares			0,18-0,32	0,24-0,51	0,20-0,32	0,01-0,14	0,01-0,02

En una realización particular de la descripción, el vector lipídico es un reactivo de transfección basado en lípidos, tal como una transfección basada en lípidos seleccionada de:

10

Lipofectamine (mezcla 3:1 (p/p) del lípido policationico, trifluoroacetato de 2,3-dioleilo-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), y DOPE);

Lipofectamine 2000;

15

Lipofectace (mezcla 1:2,5 (p/p) de bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE));

DORI-éter;

20

DORI-éter/lisolípido;

Lipofectin (mezcla 1:1 (p/p) de cloruro de N-[1-(2,3-dioleilo)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE));

DOTAP;

BioPORTER;

Cellfectin (una formulación de liposomas 1:1,5 M/M de un lípido catiónico tetrametilpalmitilespermina (TMTPS) y DOPE); y

DMRIE-C (una formulación de liposomas 1:1 M/M de un lípido catiónico bromuro de N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propanaminio (DMRIE) y colesterol).

En una realización particular de la invención, el vector lipídico es Invivofectamine® 2.0 o Invivofectamine® 3.0, en particular Invivofectamine® 3.0.

La invención también se refiere a usos del kit de diagnóstico de la invención.

En una realización particular, el kit de diagnóstico de la invención se utiliza en un método para el diagnóstico de una enfermedad. En particular, el kit se utiliza para proporcionar un patrón de calibración para el o los miARN contenidos en el kit.

En el contexto de la presente invención, la expresión "método para el diagnóstico" designa un método para el diagnóstico, pronóstico o monitorización de una enfermedad, pero también un método para evaluar la eficacia de un tratamiento contra la enfermedad.

La invención se refiere así al uso del kit de diagnóstico de la invención, en un método para el diagnóstico, pronóstico o monitorización de una enfermedad. El kit de la invención puede ser un método para el diagnóstico de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), y para clasificar a un sujeto como un potencial receptor de un tratamiento para NASH como se describe en la solicitud PCT WO2017167934.

La invención se refiere además a un método para el diagnóstico de una enfermedad, que comprende la determinación del nivel de miARN en una muestra biológica de un sujeto, en el que el nivel de dicho miARN se compara con el nivel del mismo miARN en el patrón o control positivo del kit de la presente invención.

En una realización particular, los usos y métodos de la invención comprenden la comparación del nivel del miARN determinado a partir de la muestra biológica con el nivel del miARN sintético utilizado como patrón o control positivo en el kit.

En otra realización, los usos y métodos de la invención comprenden la normalización del nivel del miARN determinado a partir de la muestra biológica al nivel del miARN sintético utilizado como control interno en el kit.

En una realización adicional, los usos y métodos de la invención comprenden la normalización del nivel del miARN determinado a partir de la muestra biológica con el rendimiento de extracción del miARN sintético utilizado como patrón o control positivo en el kit.

Los usos y métodos de la invención son útiles para la cuantificación de miARN en una muestra de fluido biológico de un sujeto, tal como muestras derivadas de sangre, por ejemplo sangre completa, suero o plasma, en particular suero.

En una realización adicional, los usos y métodos de la invención comprenden la adición de una cantidad definida del miARN sintético en el kit de la invención a la muestra biológica en la que se va a determinar un nivel de miARN. En una realización particular, el miARN sintético añadido es un miARN no humano, un miARN exógeno ausente en la muestra del sujeto. Por ejemplo, el miARN sintético o exógeno no humano puede derivar de *Caenorhabditis elegans* (cel) o *Arabidopsis thaliana* (ath). En una realización particular, el miARN añadido es cel-miR39 (en particular cel-miR-39-3p). Otros miARN no humanos para uso como miARN sintético en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, ath-miR-159a y cel-miR-40-3p.

El kit de la invención puede así utilizarse para proporcionar un control interno medido simultáneamente al miARN que se va a analizar en la muestra de fluido biológico. Se puede utilizar para calcular el nivel de miARN en la muestra utilizando la siguiente fórmula, que se proporciona para fines ilustrativos con respecto a la medida de hsa-miR-34a-5p como el miARN que se analizará en la muestra, y cel-miR-39-3p como control interno y miARN sintético añadido:

$$\text{niveles de hsa-miR-34a-5p} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

en la que:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{muestra}} - \Delta Cq_{\text{estándar}}$$

$$\Delta Cq_{\text{muestra}} = Cq_{\text{hsa-miR-34a-5p de la muestra}} - Cq_{\text{cel-miR-39-3p añadido a las muestras}}$$

$$\Delta Cq_{\text{estándar}} = Cq_{\text{hsa-miR-34a-5p del estándar positivo}} - Cq_{\text{cel-miR-39-3p añadido al estándar positivo}}$$

5

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

10 - Preparación del complejo Invivofectamine®/miRs

Los oligorribonucleótidos de miARN altamente purificados se sintetizan de forma personalizada a partir de IDT (Integrated DNA Technologies Skokie, Illinois, EE. UU.).

15 Se utilizó el reactivo Invivofectamine® 3.0 (IVF3001-3005, ThermoFisher Scientific, EE. UU.) para crear complejos con los miARN según las recomendaciones del fabricante (Pub. no. MAN0013651 Rev A.0.pdf). El complejo miARN/Invivofectamine® (IVF) se utilizó sin diluir o diluido 6 veces añadiendo 1 ml de PBS (pH 7,4).

- Preparación de patrones y controles internos

20

Para preparar los miARN patrón o controles internos, se añaden 5 µl de preparación a 1) matrices base biológicas para preparaciones patrón (es decir, suero o plasma de donantes sanos, u otra matriz base), o 2) directamente a muestras biológicas como control interno.

25 Los miARN patrón, los controles positivos y los controles internos se preparan con oligorribonucleótidos de miARN sintéticos (es decir, hsa-miR-34a-5p, cel-miR-39-3p, cel-miR-40-3p).

- Extracción de ARN pequeño

30 Las muestras a analizar se descongelan en hielo. Agite suavemente las muestras biológicas y centrifugue a 6.000xg durante 15 minutos.

La extracción automatizada con MagMax mirVana™ en el sistema KingFisher™ (KingFisher™ Flex System, número de catálogo 5400630, ThermoFisher) se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante (KingFisher™_Flex_User_Manual_5400630.pdf, número de producto N07669). Se utilizó el kit de aislamiento de ARN total MagMax mirVana™ (A27828, ThermoFisher) siguiendo la guía del usuario (MagMAX mirVana™ Total RNA Isolation Kit (manual extraction) User Guide - Pub. no. MAN0011131 - Rev. B.0.pdf).

35

- Transcripción inversa (RT)

40

La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo utilizando el kit de transcripción inversa TaqMan® MicroRNA, número de catálogo 4366597, siguiendo el protocolo del manual del usuario: TaqMan® Small RNA Assays Protocol (PN 4364031E).pdf, número de producto 4364031 Rev E 01/2011, y Taqman® MicroRNA assay RT primer [60X], número de catálogo 4440888 (formato grande). Las incubaciones se realizaron en un termociclador Bio-Rad T100 según las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad T100 thermal cycler Cat nbr 186-1096.pdf). Los ADNc se almacenaron en tubos de baja unión a -20 °C hasta su uso posterior.

45

- PCR cuantitativa

50 La expresión de los miARN maduros se cuantificó según las instrucciones del fabricante utilizando el ensayo Taqman miARN RT-qPCR 20X y TaqMan Universal Master Mix II, sin uracil-N-glicosidasa (UNG) 2X (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) en una placa de PCR ThermoFisher de 96 pocillos, pocillo transparente, semifaldón, número de catálogo AB-0900. Se utilizó un volumen fijo de 5 µl de ARN total como molde para el ensayo de qPCR utilizando un sistema en tiempo real CFX96TM - C1000 - IVD certificado según las pautas del fabricante (Bio-Rad CFX96 Touch_Instruction manual.pdf, número de producto 110021337, Rev E US/EG). Se utilizó el ensayo de TaqMan para hsa-miR-34a-5p. El producto RT de los miARN sintéticos se diluyó en serie, y se realizó PCR en todas las muestras (patrones y ARN derivado de suero). El modo de determinación de Cq fue Regresión.

55

Las secuencias de miARN maduro y la ID del ensayo Taq Man se dan en la siguiente tabla:

miARN ID	Secuencia	Número de miRbase	ID del ensayo
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG (SEQ ID NO: 1)	MIMAT0000010	000200
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU (SEQ ID NO:2)	MIMAT0000255	000426

60

RESULTADOS

A. La complejación de invivofectamine® con hsa-miR-34a-5p protege al miARN sintético de la degradación.

5 Figura 1: invivofectamine® protege el oligorribonucleótido hsa-miR-34a-5p sintético añadido al suero.

Niveles de expresión de hsa-miR-34a-5p en ausencia (A) o presencia (B) de Invivofectamine®. Caja negra: conjunto de suero de donantes sanos con niveles muy bajos de hsa-miR-34a utilizado como matriz base biológica. Caja gris: matriz base a la que se añade hsa-miR-34a-5p sintético sin invivofectamine® (IVF) antes o después de la
10 desnaturalización. Caja blanca: matriz base a la que se añade hsa-miR-34a-5p sintético encapsulado en IVF.

El hsa-miR-34a-5p se detecta en pacientes sanos (Matriz) en niveles muy bajos (33,6 Cq). La adición de un hsa-miR-34a-5p sintético utilizado como complemento después de la adición de un amortiguador desnaturalizante en el suero da como resultado una inducción (23,3 Cq). El miARN sintético se degrada si la adición se produce antes del
15 tratamiento del suero con el amortiguador desnaturalizante (Matriz + hsa-miR-34a-5p). Curiosamente, la combinación de invivofectamine® con hsa-miR-34a-5p antes de la dilución 1:6 restaura el nivel de miARN detectado cuando el miARN añadido se añade después del amortiguador desnaturalizante. El complejo miARN/invivofectamine® puede utilizarse con el complejo diluido 1/6 (Figura 1).

20 Figura 2: Estabilidad del complejo miARN/invivofectamine® a 4 °C hasta 4 horas.

Se analizaron dos condiciones de preparación del complejo miARN/invivofectamine®: temperatura 4 °C (cajas negras) frente a temperatura ambiente (TA, cajas blancas), y tiempo entre la preparación del complejo y su uso (0, 1 y 4 horas). Matriz: conjunto de suero de donantes sanos (Etablissement Français du Sang: EFS) con niveles muy bajos de hsa-
25 miR-34a-5p.

A temperatura ambiente, los niveles de hsa-miR-34a-5p disminuyen en la matriz y en la matriz con hsa-miR-34a-5p añadido. Los niveles se mantienen constantes a 4 °C. Este resultado sugiere que el procedimiento de adición en muestras derivadas de sangre puede retrasarse a 4 °C después de la preparación del complejo
30 miARN/invivofectamine® (Figura 2).

Figura 3: Invivofectamine® protege el oligorribonucleótido hsa-miR-34a-5p sintético añadido al suero a 4 °C hasta 4 semanas.

35 Los niveles de hsa-miR-34a-5p son estables en el suero enriquecido con el complejo hsa-miR-34a-5p/invivofectamine® hasta 4 semanas a 4 °C (Figura 3).

Figura 4: Estabilidad de miARN sintético en suero cuando se combina con invivofectamine® después de ciclos repetitivos de congelación-descongelación a -20 °C.

40 Se analizaron 5 ciclos de congelación/descongelación. Los niveles de hsa-miR-34a-5p no se ven afectados por ciclos repetitivos de congelación/descongelación a -20 °C cuando el miARN sintético se combina con invivofectamine®.

B. Robustez del ensayo de hsa-miR-34a-5p utilizando complejos miRs/IVF

45

Tabla 1: Variabilidades intra- e interensayo de hsa-miR-34a-5p medidas utilizando el control positivo patrón (n=12 para cada condición de prueba) y el complejo cel-miR-39-3p/IVF como control interno (añadido en cada muestra). Las muestras se incubaron a 4 °C durante 4 horas o se congelaron directamente a -80 °C.

	Variabilidad intraensayo						Variabilidad entre ensayos					
	Experimento #1			Experimento #2			Experimento #1+2					
	Cel-miR-39-3p			Cel-miR-39-3p			Cel-miR-39-3p			hsa-miR-34a-5p		
	-80 °C	4 °C	-80 °C	-80 °C	4 °C	-80 °C	4 °C	-80 °C	4 °C	-80 °C	4 °C	-80 °C
Media (Cq)	28.30	28.13	31.40	28.34	28.07	31.38	31.17	28.32	28.10	31.39	31.21	
SD (Cq)	0.12	0.08	0.28	0.19	0.12	0.42	0.24	0.15	0.10	0.35	0.25	
CV (%)	0.41	0.28	0.89	0.66	0.41	1.33	0.78	0.54	0.36	1.11	0.81	
Media (veces)	1.01		1.12	1.02		1.17		1.02		1.15		
SD (veces)	0.16		0.17	0.23		0.16		0.2		0.17		
CV (%)	16.01		15.47	22.37		13.92		19.31		14.41		

Los datos se expresan como media de Cq +/- SD o como el nivel de expresión de hsa-miR-34a-p, en número de veces, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{niveles de hsa-miR-34a-p} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

en la que:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{muestra}} - \Delta Cq_{\text{estándar}}$$

$$\Delta Cq_{\text{muestra}} = Cq_{\text{hsa-miR-34a-5p de la muestra}} - Cq_{\text{cel-miR-39-3p añadido a las muestras}}$$

$$\Delta Cq_{\text{estándar}} = Cq_{\text{hsa-miR-34a-5p del estándar positivo}} - Cq_{\text{cel-miR-39-3p añadido al estándar positivo}}$$

Los patrones positivos son suero agrupado de pacientes con NASH, n=12.

El miARN añadido es un miARN no humano: cel-miR-39-3p en Cq=28. Invivofectamine® se utiliza en una relación de cel-miR-39-3p/IVF = 100/100.

Después de la preparación, el complejo IVF/cel-miR-39 se incubaba a 4 °C durante 4 horas o se congelaba directamente a -80 °C.

Los CV no son significativamente diferentes entre condiciones. La cuantificación normalizada de hsa-miR-34a-5p permanece estable y reproducible entre condiciones.

La producción del control interno es robusta.

	Control interno = Cel-miR-39-3p en IVF		
	hsa-miR-34a-5p (Cq)	Cel-miR-39-3p (Cq)	hsa-miR-34a-5p (veces=2 ^{-ΔΔCq})
Media	31,43	28,24	1,01
Sd	0,61	0,54	0,15
CV	1,93 %	1,91 %	14,60 %

Tabla 2: Comparación de la variabilidad de la medida de hsa-miR-34a-5p utilizando el control positivo patrón (n=12 para cada condición de prueba), y el complejo cel-miR-39-3p/IVF o Cel-miR-40-3p/IVF como controles internos (añadidos a cada muestra). Los datos se expresan como media de Cq +/- SD, o como nivel de hsa-miR-34a-5p en número de veces.

	Control interno = Cel-miR-40-3p en IVF		
	hsa-miR-34a-5p (Cq)	Cel-miR-40-3p (Cq)	hsa-miR-34a-5p (veces=2 ^{-ΔΔCq})
Media	31,37	28,23	1,01
Sd	0,84	0,81	0,11
CV	2,69 %	2,87 %	10,90 %

C. Rendimientos del ensayo de hsa-miR-34a-5p.

Se utilizaron patrones y controles internos para evaluar los rendimientos del ensayo de hsa-miR-34a-5p en pacientes con NASH.

Figura 5: Curva ROC de hsa-miR-34a-5p con control interno (A) o sin control interno (B) en una cohorte clínica con pacientes con enfermedad NASH (n=562 pacientes, NTBT = 271 pacientes y TBT = 291 pacientes). La condición diana para ser clasificada como TBT fue NAS ≥ 4 + F ≥ 2.

El suero de 562 pacientes del estudio RESOLVE-IT con biopsia hepática correspondiente se procesó para la validación del ensayo con un control interno. Se utilizaron muestras de suero de todos los pacientes para evaluar los rendimientos del ensayo de hsa-miR-34a-5p utilizando un control interno (Cel-miR-40-3p) complejo con IVF, y después se comparó con el ensayo de hsa-miR-34a-5p sin el uso de control interno. Los pacientes se dividieron en 2 grupos: grupo #1: Pacientes que no deben ser tratados (NTBT), con puntuación NAS < 4 y fibrosis < 2, y grupo #2: Pacientes a tratar (TBT), con puntuación NAS ≥ 4 y fibrosis ≥ 2. Los pacientes con puntuación NAS de 4 a 6 y grado de fibrosis de 1 a 3 fueron los más representativos de esta cohorte clínica. Los pacientes con condición diana (TBT: NAS ≥ 4 + F ≥ 2) representan el 51,8 % de la población total de la cohorte.

Tabla 3: Características del área bajo la curva para diagnosticar pacientes con TBT con NAS ≥ 4 y F ≥ 2.

Condición	Con Control Interno	Sin control interno
-----------	---------------------	---------------------

Área	0,8108	0,7838
Error Estándar	0,01813	0,01935
Intervalo de confianza del 95 %	0,7753 a 0,8463	0,7458 a 0,8217
Valor p	<0,0001	<0,0001
Datos		
Controles (NTBT2)	271	271
Pacientes (TBT2)	291	291
Controles faltantes	0	0
Pacientes faltantes	0	0

El AUROC para el ensayo de hsa-miR-34a-5p utilizando el control interno fue 0,81 (IC del 95 %: 0,77-0,85) y el AUROC para el ensayo de hsa-miR-34a-5p, en el que no se utilizó el control interno, representa sólo 0,78 (IC del 95 %: 0,74-0,82), lo que indica que el ensayo de hsa-miR-34a-5p que utiliza el control interno funciona significativamente mejor que el ensayo sin control interno (Figura 5). En conjunto, todos estos datos indican que el ensayo de hsa-miR-34a-5p es más específico y sensible cuando se utiliza el complejo Cel-miR-40-3p/IVF para cuantificar hsa-miR-34a-5p como marcador de la enfermedad NASH.

C) Comparación Invivofectamine®/Lipofectamine

a- Preparación del complejo Invivofectamine® o Lipofectamine/miRs

Los oligorribonucleótidos imitadores de miRs altamente purificados se sintetizan de forma personalizada a partir de IDT (Integrated DNA Technologies Skokie, Illinois, EE. UU.). Para pruebas *in vitro* como patrones o controles internos, se preparan 100 µl de disolución imitadora de miRs mezclando 50 µl de miRs en agua libre de ARNasa (ref. 733-2573, VWR) con 50 µl de amortiguador de complejación (reactivo Invivofectamine® 3.0 (IVF3001-3005, ThermoFisher Scientific). Por ejemplo, utilice miR a 12,5 fmol/ml para preparar el Control 28Cqs, miR a 2,5 fmol/ml para preparar el Control 30Cqs, y miR a 0,5 fmol/ml para preparar 33Cqs. Posteriormente, los miRs diluidos se añaden inmediatamente a 20 µl de invivofectamine® 3.0 o Lipofectamine (life Technologies Carlsbad, CA, EE. UU.) previamente llevado a temperatura ambiente. Después, Invivofectamine® (o Lipofectamine) y los miRs diluidos se agitan durante 3 segundos para garantizar la formación del complejo miRs-IVF 3.0 (o miRs-Lipofectamine). A continuación, la mezcla invivofectamine® (o Lipofectamine)-miRs se incuba durante 30 min a 50 °C, y finalmente el complejo se diluye 6 veces añadiendo 1 ml de PBS (pH 7,4) para obtener una concentración final de respectivamente 0,52 fmol/ml, 104 amol/ml y 20,8 amol/ml para los Controles 28Cqs, 30Cqs y 33Cqs. La preparación se conserva congelada a -20 °C en alícuotas.

Para preparar miRs patrón o controles internos, se añaden 5 µl de preparación a 1) matrices base biológicas para preparaciones patrón (es decir, suero o plasma de donantes sanos, o matrices base disponibles comercialmente), o 2) directamente a muestras biológicas como control interno.

Comparación de las condiciones del complejo Invivofectamine®/Lipofectamine

Se probaron varias condiciones de preparación del complejo Invivofectamine®/hsa-miR-34-a-5p o Lipofectamine/hsa-miR-34-a-5p: temperatura (4 °C frente a temperatura ambiente), y tiempo entre la preparación del complejo y su uso (0, 1 y 4 horas). La matriz es un conjunto de sueros de donantes sanos con niveles muy bajos de hsa-miR-34a-5p. El ARN patrón es un conjunto de ARN con niveles conocidos de hsa-miR-34a-5p. Todos los datos se expresan como media de ciclos de amplificación de qPCR (Cq) +/- SD con n = 3. ND: No detectable.

Figura 6: Condiciones de preparación del complejo Invivofectamine® (IVF)/hsa-miR-34-a-5p.

Temperatura; 4 °C (cajas negras), temperatura ambiente (TA, cajas blancas). También se analizó el tiempo transcurrido entre la preparación del complejo y su uso (0, 1 y 4 horas).

NRT: Sin control de transcriptasa inversa, NTC: Sin control de molde, control negativo: PCR en blanco. Todos los datos se expresan como media de ciclos de amplificación de qPCR (Cq) +/- SD con n = 3. ND: No detectable.

Figura 7: Condiciones de preparación del complejo Lipofectamine/hsa-miR-34-a-5p.

Temperatura; 4 °C (cajas negras), temperatura ambiente (TA, cajas grises). Tiempo entre la preparación del complejo y su uso (0, 1 y 4 horas).

NRT: Sin control de transcriptasa inversa, NTC: Sin control de molde, control negativo: PCR en blanco. Todos los datos se expresan como media de ciclos de amplificación de qPCR (Cq) +/- SD con n = 3. ND: No detectable.

Conclusión: En todas las condiciones (temperatura y tiempo), no se observó protección de miR-34a-5p con Lipofectamine. Por el contrario, el uso de Invivofectamine® protege el complejo matriz + hsa-miR34a-5p.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de diagnóstico que comprende más de un recipiente que comprende un complejo de un microARN sintético (miARN) y un vector lipídico, en el que dicho miARN sintético está en una concentración definida, en el que el vector lipídico se selecciona de lípidos conjugados con PEG,
5 en el que el kit comprende:
- uno o más recipientes que comprenden un primer miARN sintético; y
10 - uno o más recipientes que comprenden un segundo miARN sintético diferente del primer miARN.
2. El kit de diagnóstico según la reivindicación 1, en el que el kit comprende:
15 - un primer conjunto de recipientes que contienen un primer miARN sintético, en el que dicho primer miARN sintético está en una concentración diferente en cada recipiente del primer conjunto de recipientes; y
- un segundo conjunto de recipientes que contienen un segundo miARN sintético, en el que dicho segundo miARN
20 sintético se encuentra en una concentración diferente en cada recipiente del segundo conjunto de recipientes.
3. El kit de diagnóstico según la reivindicación 1 o 2, en el que al menos uno del uno o más recipientes comprende hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-452-5p, cel-miR39-3p o cel-miR-40-3p.
4. El kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el vector lipídico comprende
25 además un lípido neutro.
5. El kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende más de un recipiente que comprende un complejo de un microARN sintético (miARN), un vector lipídico, y una matriz seleccionada del grupo que consiste en suero sintético, plasma empobrecido en ácido nucleico, y muestra derivada de sangre, en el que dicho
30 miARN sintético se encuentra en una concentración definida.
6. El uso del kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en un método para la cuantificación de un miARN en un fluido biológico de un sujeto, en particular un mamífero, más particularmente un ser humano.
35 7. El uso según la reivindicación 6, en el que la cuantificación es cuantificación relativa o absoluta.
8. El uso según la reivindicación 6, en el que la cuantificación es cuantificación relativa o absoluta normalizada.
9. El uso según las reivindicaciones 7 u 8, en el que el kit se utiliza para establecer una curva de concentración patrón
40 del miARN.
10. El uso según la reivindicación 6 u 8, en el que el kit se utiliza para añadir a la muestra biológica que se va a analizar una cantidad definida del miARN sintético comprendido en un recipiente del kit.
45 11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que la muestra biológica es sangre, suero, plasma, orina, saliva o esperma, en particular sangre, suero o plasma, más particularmente suero.

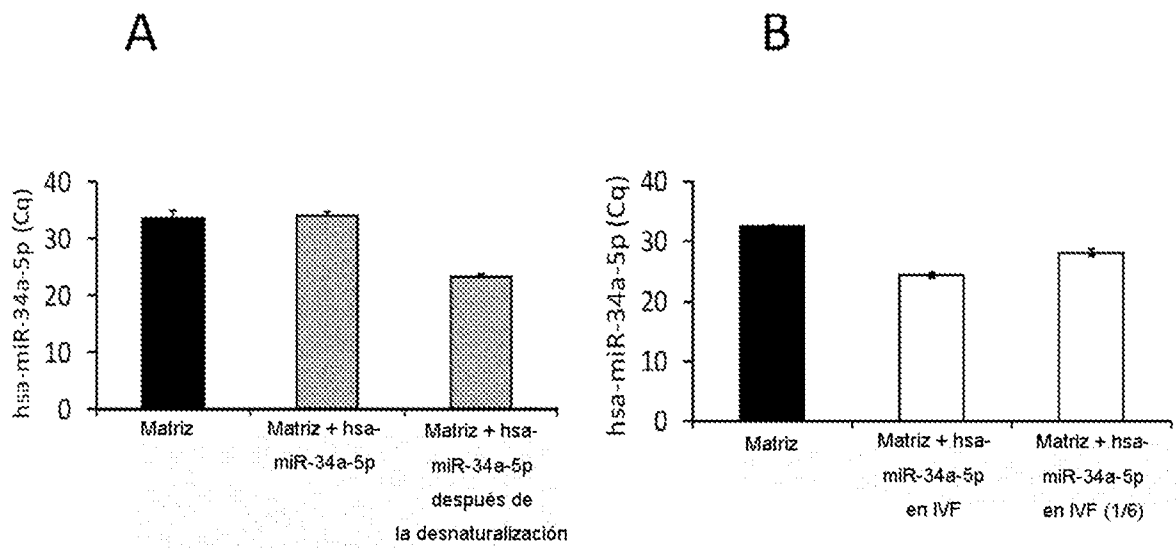


Figura 1

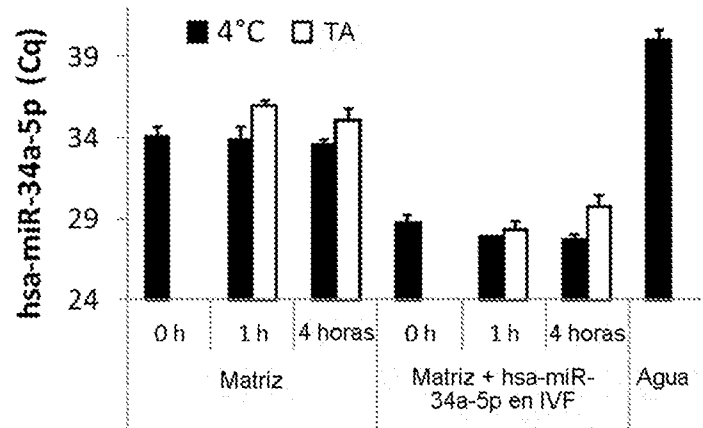


Figura 2

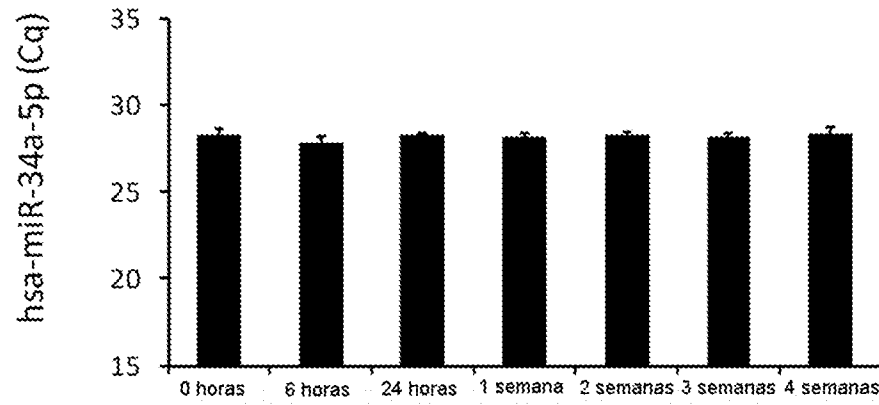
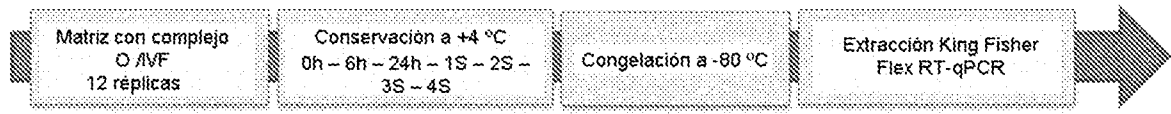


Figura 3

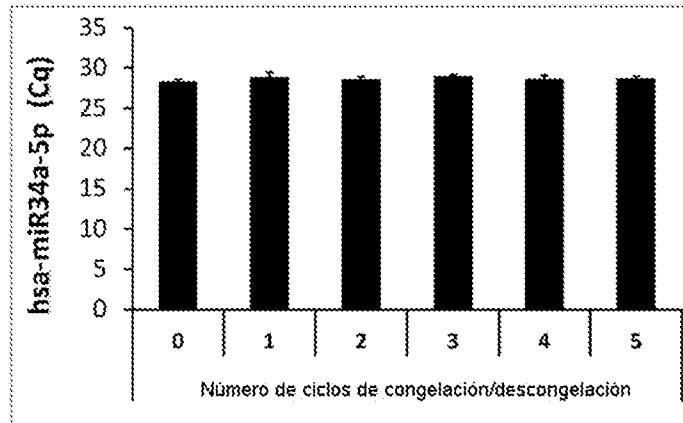
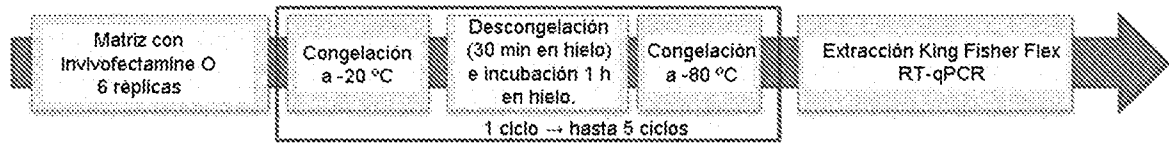


Figura 4

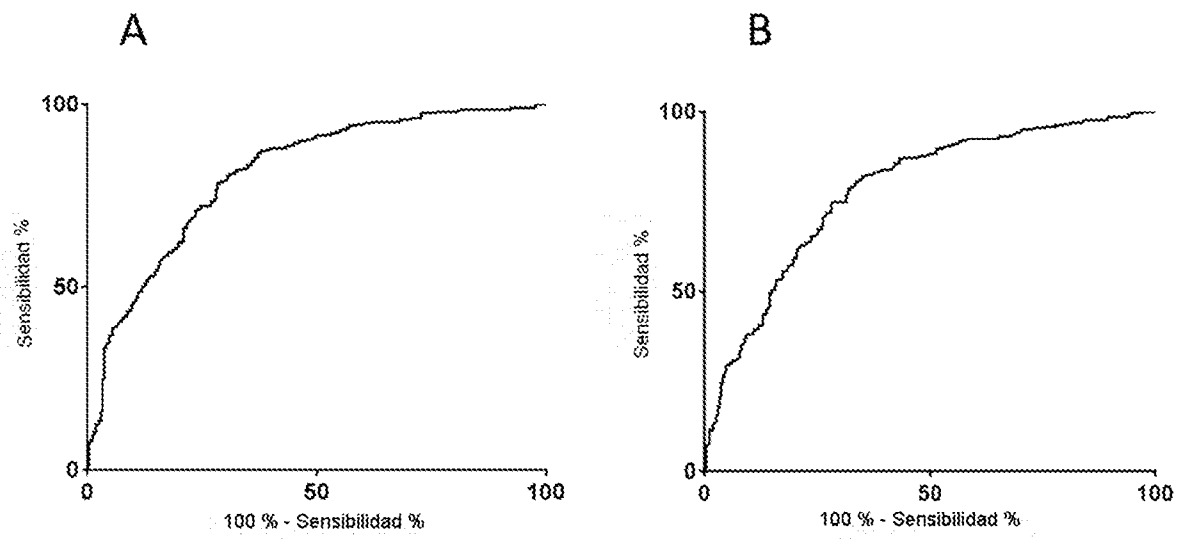


Figura 5

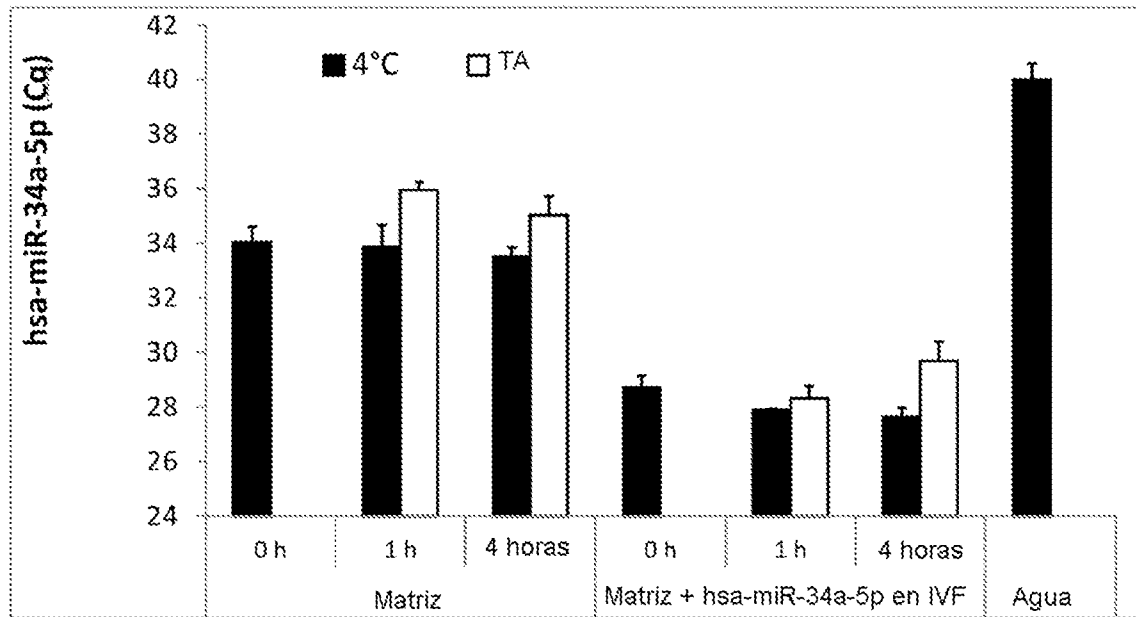


Figura 6

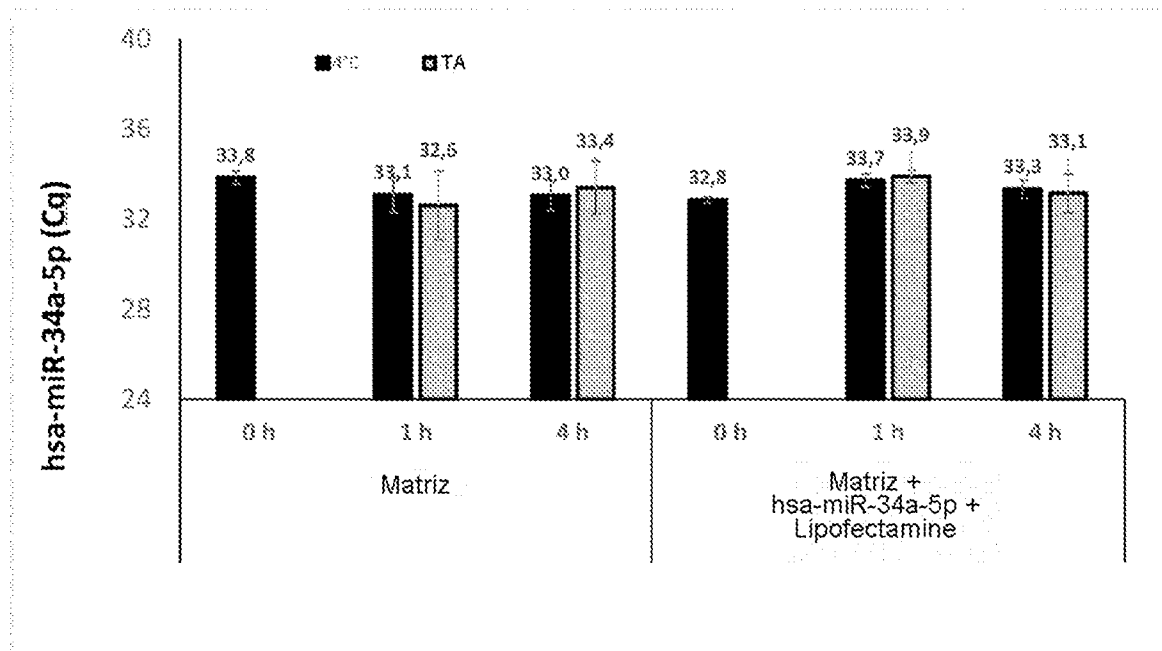


Figura 7