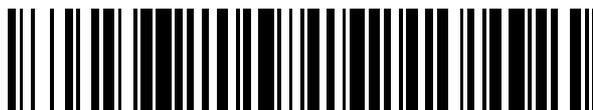


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 153**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11845889 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2646554**

54 Título: **Predicción de nacimiento prematuro espontáneo mediante la medición de ácidos nucleicos libres de células en sangre materna**

30 Prioridad:

30.11.2010 US 418375 P

30.11.2010 US 418368 P

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

11.10.2016

73 Titular/es:

DONG, YAFENG (50.0%)

14208 Bond Street

Overland Park KS 66221, US y

WEINER, CARL (50.0%)

72 Inventor/es:

DONG, YAFENG y

WEINER, CARL

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

Observaciones :

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

ES 2 586 153 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

Predicción de nacimiento prematuro espontáneo mediante la medición de ácidos nucleicos libres de células en sangre materna

5

ANTECEDENTES

El parto prematuro sigue siendo un problema social importante debido a las complicaciones en la salud a corto y largo plazo de los recién nacidos prematuros. Muchos bebés prematuros viven el inicio de su vida en unidades de cuidados intensivos y críticos, y con frecuencia tienen muchos problemas de salud hasta la edad adulta en comparación con los bebés nacidos a término. Aproximadamente el 12 % de los bebés nacidos son producto de un parto prematuro (PTB), que se puede caracterizar como un parto espontáneo antes de las 37 semanas de gestación. El PTB también se asocia al > 70 % de las muertes neonatales y a casi la mitad de las discapacidades neurológicas a largo plazo. A pesar del gran esfuerzo entre todos los sectores de la salud, la tasa de PTB ha continuado aumentando. En consecuencia, sigue existiendo una gran necesidad de identificar a mujeres en riesgo de sufrir parto prematuro y comprender mejor los mecanismos que culminan en PTB.

Mayor-Lynn K. et al.: "Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor", *Reproductive Sciences* 2011 Sage Publications Inc. USA, vol. 18, no. 1, 15 de noviembre de 2010, páginas 46-56, describen estudios sobre el perfil de expresión de microARN y ARNm en placentas de mujeres con parto espontáneo prematuro, preeclampsia y de control sano a término, por los que se comprobó que el transcriptoma de la placenta difiere entre los 3 grupos antes mencionados.

El documento WO 2009/093254 A2 contiene enseñanzas relacionadas con los datos de suero de microARN de mujeres con preeclampsia, y describe varios microARN que difieren en sus niveles de expresión respecto a los de mujeres sanas, en el que el ARN se obtiene siempre a partir de muestras de suero materno.

Yogev Y. et al.: "110: Spontaneous preterm labor - a possible role for micro-RNA", *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, Mosby, St. Louis, MO, US, vol. 197, no. 6, 1 de diciembre de 2007, página S44 y Yogev Y. et al.: "459: MicroRNA: A central new player in post-transcriptional regulation pathway in preeclampsia", *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, Mosby, St. Louis, MO, US, vol. 197, no. 6, 1 de diciembre de 2007, página S135 desvela un estudio de mujeres con parto prematuro espontáneo y con parto a término, cada uno de ellos por cesárea. Se extrajo microARN del miometrio, la placenta, el líquido amniótico y el suero materno y a continuación se cuantificó, con los que se ha comprobado diferencias en la expresión de microARN entre las mujeres con parto prematuro espontáneo y parto a término.

Chim Stephen S. C. et al.: "Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma", *Clinical Chemistry*, American Association for Clinical Chemistry, Washington, DC, vol. 54, no. 3, 1 de marzo de 2008, páginas 482-490, desvelan la detección y caracterización de microARN específicos de la placenta en plasma materno y concluyen que estos microARN asociados al embarazo pueden ser adecuados para el seguimiento del embarazo.

Wright C. F. et al.: "The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis", *Human Reproduction update*, Oxford University Press, Oxford, GB, vol. 15, no. 1, 1 de enero de 2009, páginas 139-151 desvelan el uso de ácidos nucleicos particulares libres de células en sangre materna, procedentes del feto y detectados durante el embarazo, para el diagnóstico prenatal no invasivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La información anterior y siguiente, así como otras características de la presente divulgación se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas, tomadas junto con los dibujos adjuntos. Entendiendo que estos dibujos representan solamente algunos ejemplos de realización de acuerdo con la divulgación y, por lo tanto, no se deben considerar limitantes de su alcance, la descripción se describirá con especificidad y detalles adicionales mediante el uso de los dibujos adjuntos, en los que:

55

Las Figuras 1A-1D ilustran que nuestras secuencias de normalización de nuevo ARN mensajero (ARNm) descubierto de PPIA están más estabilizadas (Figuras 1D) en comparación con las secuencias de normalización publicadas (Figuras 1A, 1B, y 1C);

Las Figuras 2A-2D ilustran que nuestros nuevos ARNs:U6 descubiertos no se ven afectados por una edad gestacional diferente; snARN:U6 desempeña un mejor papel como secuencias de normalización de micro ARN (miARN) en comparación con las secuencias reportadas;

- 5 La Figura 3 ilustra los resultados de un gen de alto rendimiento de miARN de PLC seleccionados con micromatrices validados por una plataforma de PCR en tiempo real como biomarcadores de PTB;

Las Figuras 4A-4B ilustran que los biomarcadores de PTB en miARN de PLC se pueden alterar por la gestación, MIR-99a se puede activar con tan solo 16 semanas;

10

La Figura 5A incluye una reconstrucción de un plásmido de ADN que contiene uno del ARNm de PLC-ApoA4;

La Figura 5B incluye una imagen de una electroforesis en gel que muestra que la reconstrucción del vector ApoA4 se ha realizado con éxito;

15

La Figura 5C ilustra que la proteína ApoA4 celular de miometrio se puede regular por aumento con el plásmido de ADN ApoA4; y

- 20 La Figura 5D ilustra que el biomarcador de ARNm de PLC-ApoA4 puede activar la concentración intracelular de Ca^{2+} en la célula de miometrio consistente con una mejora de la contractilidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 25 En la siguiente descripción detallada se hace referencia a los dibujos adjuntos, que forman parte de la misma. En los dibujos, símbolos similares suelen identificar componentes similares, a menos que el contexto dicte otra cosa. No se pretende que las realizaciones ejemplares descritas en la descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones sean limitantes. Se pueden utilizar otras formas de realización, y se pueden realizar otros cambios, sin apartarse del espíritu o alcance de la materia que se presenta en este documento. Se entenderá fácilmente que los aspectos de la presente divulgación, que se describen en general en este documento, y se ilustran en las Figuras, se pueden
- 30 disponer, sustituir, combinar, separar, y diseñar en una amplia variedad de configuraciones diferentes, todas las cuales están contempladas explícitamente en este documento.

- En general, la presente invención se refiere al uso de ácidos nucleicos para predecir el parto prematuro (PTB) o determinar la probabilidad o la susceptibilidad de PTB en una mujer. Los ácidos nucleicos útiles para el diagnóstico
- 35 de PTB pueden incluir cebadores y/o sondas de ácidos nucleicos que se unen a secuencias de ácido nucleico específicas, así como ácidos nucleicos que aumentan o disminuyen en una mujer que puede ser susceptible de PTB. Los ácidos nucleicos pueden incluir secuencias de ácidos nucleicos específicas pertinentes para el PTB, cuyas secuencias funcionan como biomarcadores para el PTB. Los kits de diagnóstico pueden estar provistos de cebadores y/o sondas de ácido nucleico específicos, marcados o no marcados, que se pueden unir selectivamente a
- 40 ácidos nucleicos asociados al PTB. Los kits de diagnóstico también pueden incluir cebadores de ácido nucleico que se pueden utilizar para la amplificación de ácidos nucleicos asociados al PTB. Los kits de diagnóstico pueden incluir sondas que pueden identificar la presencia de ciertas secuencias de ácidos nucleicos. En un aspecto, todos los ácidos nucleicos específicos de PTB se pueden incluir en las tarjetas de PCR a medida. Al usar la técnica de PCR de alto rendimiento, se pueden utilizar tarjetas de PCR para el diagnóstico y la determinación de la presencia y/o
- 45 cantidad de ácido nucleico. Los métodos de la presente invención pueden incluir diagnosticar si una mujer embarazada es susceptible de PTB o no.

- La presente invención también puede incluir ácidos nucleicos de normalización (por ejemplo, ARNm y miARN) que tienen secuencias de normalización que se pueden utilizar para normalizar los datos de niveles relativos de ácidos
- 50 nucleicos de una muestra a la siguiente. Se ilustra que nuestra nueva secuencia de normalización de ARNm y miARN descubierta está estabilizada y no se ve afectada por la edad gestacional en comparación con los informes publicados anteriormente. Estos ácidos nucleicos de normalización también se pueden incluir en los kits de diagnóstico. Los métodos de la presente invención pueden utilizar ácidos nucleicos de normalización en los protocolos de normalización de muestras. Estos protocolos pueden ser útiles para la normalización de las cantidades
- 55 de ácido nucleico entre las muestras. Si bien estos ácidos nucleicos de normalización son útiles para protocolos de diagnóstico de PTB, también se pueden utilizar para normalizar las cantidades de ácido nucleico para cualquier fin.

Aunque el ARN es un ácido nucleico preferido para las composiciones y métodos descritos en este documento, también es posible utilizar ADN o híbridos de ARN/ADN como sondas y/o cebadores de ácido nucleico para el

diagnóstico o protocolos de normalización. Sin embargo, los ácidos nucleicos que se identifica que están presentes, regulados por aumento, o regulados por disminución en los protocolos de diagnóstico generalmente serán de ARN puesto que se transcribe a partir de ADN (por ejemplo, ARN complementario) o se procesa en ARNm. El ARN también puede ser ARN regulador, tal como ARN pequeños no codificantes (miARN, siARN, snARN, o snoARN) que están involucrados en el silenciamiento o la transcripción o la regulación de la traducción de genes. Además, los protocolos de normalización generalmente se llevarán a cabo con ARN.

Los ácidos nucleicos pueden ser ARN de plasma libre de células (PLC), que se refiere a ARN derivado de una variedad de células dentro de diferentes órganos, y que circula sistémicamente. El ARN de PLC puede incluir varios tipos, incluyendo ARN codificante (por ejemplo, ARNm) y ARN no codificantes (por ejemplo, siARN, miARN, snoARN, snARN). Utilizando técnicas de micromatrices, examinamos todos los ARNm de genes y ARN no codificantes, incluyendo siARN, miARN, snoARN, y snARN. Solo se comprobó por parto prematuro solo se puede alterar un poco de ARNm y el miARN. En un aspecto, el ARN de PLC puede incluir ARNm de PLC y miARN de PLC maternos. Los ARN de PLC se pueden detectar en plasma procedente de la circulación periférica de la madre mucho antes de los síntomas o signos de parto prematuro. Los ácidos nucleicos se pueden caracterizar como biomarcadores de PTB en ARN de PLC, ya que individualmente o en combinación pueden proporcionar un biomarcador para PTB y predicción de PTB o susceptibilidad a PTB. Los biomarcadores de PTB en ARN de PLC se pueden utilizar para proporcionar un patrón de biomarcadores de PTB que pueden reflejar los mecanismos subyacentes que dan lugar a PTB o susceptibilidad al mismo.

En una realización, el ARN de PLC puede consistir en secuencias específicas de ácido nucleico de ARN. Es decir, las secuencias pueden ser en su totalidad o en una parte un ARNm o miARN. Las propias secuencias se pueden utilizar para la preparación de cebadores y/o sondas para los métodos descritos en este documento, y se pueden usar en dianas para la detección y para estudios adicionales en el desarrollo de terapias dirigidas. Las secuencias de ácido nucleico de ARN de PLC están dentro de la Lista de secuencias y tienen unas SEQ ID NOs: 1-303. Estas secuencias en la Lista de secuencias se proporcionan en formato de ADN; sin embargo, estas secuencias se pueden emplear con el formato de ARN con uracilo (U) en lugar de timina (T). En consecuencia, las referencias a las SEQ ID NOs 1-303 de la Lista de secuencias pueden estar en formato de ARN, formato de ADN, o híbrido de ADN/ARN. En una realización preferida, las SEQ ID NOs 1-303 de la Lista de secuencias son específicamente ARN, tales como para el miARN y los ARNm descritos en este documento, y por lo tanto cualquier "T" se puede sustituir con un "U" tal como entiende un experto en la materia. Por lo tanto, una mención de las SEQ ID NOs 1-303 de la Lista de secuencias puede referirse específicamente a los ácidos nucleicos de ARN correspondientes.

Por consiguiente, se pueden utilizar los biomarcadores de PTB en ARN de PLC para el desarrollo de farmacoterapia dirigida que se podría iniciar antes de que ocurra la activación del miometrio, en lugar de después de la aparición de síntomas tales como acortamiento cervical o contracciones. Los biomarcadores de PTB en ARN de PLC se pueden utilizar con el fin de diseñar una terapia que pueda modular la producción de ciertas sustancias biológicas, tales como las proteínas asociadas a la activación del miometrio o la inhibición de la activación del miometrio. Los biomarcadores de PTB también se pueden utilizar en protocolos de diagnóstico para otros trastornos del embarazo, tales como placentación anormal (por ejemplo, preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino, etc.), maduración cervical disfuncional, cuello uterino corto, u otros en los que los mecanismos patológicos se superponen o se cruzan. Los biomarcadores de PTB se pueden utilizar para identificar patrones de transcriptoma de PLC materno indicativos de ciertas malformaciones fetales, tales como para el diagnóstico de triploidies comunes.

En una realización, la presente invención puede utilizar una combinación de biomarcadores de PTB en ARN de PLC para el diagnóstico de un trastorno del embarazo o la susceptibilidad al mismo, y proporcionar una terapia con el fin de tratar y/o prevenir el trastorno del embarazo. Por ejemplo, se puede utilizar un protocolo de diagnóstico para diagnosticar o predecir el desarrollo último de un cuello uterino ecográficamente corto, y a continuación un profesional médico puede tratar la dolencia con la suplementación de progesterona a partir de la información obtenida de los biomarcadores de PTB, diagnóstico y tratamiento que podría ser tan temprano como a las 12, 16, 18, o 22 semanas de gestación antes de que el cuello del útero se acorte de facto.

En una realización, un kit de diagnóstico puede estar provisto de uno o más biomarcadores de PTB en ARN de PLC y de las instrucciones de uso que se pueden utilizar para identificar en mujeres la susceptibilidad de PTB lo antes posible (por ejemplo, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 o hasta 32 semanas) para permitir la intervención antes de que se active de manera irrevocable un indicador de PTB, tal como la activación del miometrio o la maduración cervical o ambos. El kit de diagnóstico puede incluir uno o varios biomarcadores de PTB en una sola composición o tarjeta de PCR o punto de tarjeta de PCR, en donde se puede utilizar cada biomarcador de PTB para orientar a diferentes causas de PTB. Como alternativa, dos o más de dichos biomarcadores de PTB se pueden utilizar juntos

para maximizar los valores predictivos de la prueba. El kit de diagnóstico puede incluir ácidos nucleicos que son el complemento de las secuencias de biomarcadores de PTB en ARN de PLC que se utilizan para realizar el diagnóstico. Estos ácidos nucleicos pueden ser los cebadores y/o sondas para dicho protocolo de diagnóstico. Los ácidos nucleicos también se pueden incluir en plásmidos para la expresión de las secuencias de biomarcadores de PTB. El kit de diagnóstico también puede identificar las secuencias de biomarcadores de PTB en ARN de PLC que se han de identificar como reguladas por aumento o reguladas por disminución, y puede especificar la secuencia de ARNm, miARN, su secuencia general, o las secuencias exactas de dichos biomarcadores de PTB en ARN de PLC que son específicas a las que se hibridan los cebadores y/o sondas. Los biomarcadores de PTB en ARN de PLC tienen secuencias que se incluyen en la Lista de secuencias con las SEQ ID NOs: 5-300. En algunos casos, tales como secuencias más cortas, se puede utilizar toda la secuencia indicada, y en otros casos se pueden utilizar porciones únicas de las secuencias que son únicas y específicas para ese ARNm o miARN en la invención descrita en el presente documento.

SECUENCIAS DE NORMALIZACIÓN

La cuantificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN) extraídos de una muestra biológica puede ser un dato importante. La cuantificación real de ARN en una muestra y su comparación con otras secuencias de ARN en una sola muestra o en varias muestras por lo general requiere una secuencia de ácido nucleico de normalización. La secuencia de normalización puede ser ARN que tiene una cantidad o nivel de expresión que generalmente es estable en las condiciones estudiadas. Es decir, la secuencia de normalización puede tener una cantidad o nivel que esencialmente no se ve alterado por ninguna circunstancia fisiológica presente en un sujeto, y por lo tanto la secuencia de normalización se pueden utilizar para normalizar la cantidad de ácido nucleico en muestras separadas para su comparación. Las muestras separadas pueden ser de diferentes sujetos o del mismo sujeto en diferentes puntos de tiempo, tales como diferentes puntos de tiempo en el embarazo. Por ejemplo, la secuencia de normalización se puede utilizar para normalizar la cantidad de ARN en los estudios de Q-RT-PCR, tal como por normalización de la cantidad de la secuencia de ARN de interés. Las secuencias de normalización descritas en este documento se pueden usar solas o en combinación, y se pueden utilizar para normalizar las muestras a analizar para biomarcadores de PTB. Sin embargo, las secuencias de normalización se pueden utilizar para normalizar la cantidad de ARN en diferentes muestras para otros fines distintos que para los biomarcadores de PTB. De este modo, las secuencias de normalización se pueden utilizar como secuencias de normalización generales para normalizar la cantidad de ARN en diferentes muestras para cualquier fin. Por lo tanto, las secuencias de normalización proporcionadas en este documento pueden servir para la cuantificación de ARN libre aislado a partir de muestras biológicas.

Se ha determinado que las secuencias de normalización presentadas anteriormente utilizadas en otros tejidos para la cuantificación de ARN aislado (por ejemplo, ARNm: ARN 18s, RPLP0, GAPDH; miARN: miR-103, miR-146a, y miR-197) se expresaban de forma inconsistente en muestras de plasma de control o se alteraban por el embarazo, la edad o la enfermedad de gestación (véase Figuras 1A-1C y 2A-2C). Por lo tanto, se buscaron e identificaron nuevas secuencias de normalización (véase Figuras 1D y 2D). Estas nuevas secuencias de normalización pueden incluir secuencias de ARNm de PLC y miARN de PLC que esencialmente permanecen inalteradas en cualquier condición, tal como el embarazo. Sin embargo, las secuencias de ARN de normalización de PLC y los correspondientes procesos se pueden aplicar igualmente a casi cualquier estado de enfermedad que va desde el embarazo y el parto prematuro a malignidad a enfermedad cardiovascular a enfermedad ósea o enfermedad de las articulaciones o similares.

En una realización, la secuencia de normalización incluye un ARN circulante. Dicha secuencia de normalización se puede describir como peptidilprolil isomerasa A (es decir, ciclofilina A, rotmasa A) humana (es decir, de *Homo sapiens*), que está codificada por el gen PPIA. La secuencia de normalización puede ser el ARNm para la peptidilprolil isomerasa. La secuencia de normalización de la peptidilprolil isomerasa se puede encontrar con el número de acceso: NM_021130 y/o NM_001008741. La secuencia de normalización de la peptidilprolil isomerasa se define en este documento como SEQ ID NO: 1, y puede ser útil para la normalización de ARNm.

En una realización, la secuencia de normalización puede incluir miARN. Dicha secuencia de normalización puede ser un ARN pequeño nuclear de *Drosophila melanogaster*, tal como snARN:U6. La secuencia de normalización snARN:U6 puede ser snARN:U6 en 96Aa, 96:Ab, y/o 96Ac. Estas secuencias de normalización se pueden describir como snARN:U6:96Aa (SEQ ID NO: 2 para miARN), snARN:U6:96Ab (SEQ ID NO: 3 para miARN), y/o snARN:U6:96Ac (SEQ ID NO: 4 de miARN), y se pueden encontrar con los siguientes números de acceso, respectivamente: NR_002081 (snARN:U6:96Aa); NR_002082 (snARN:U6:96Ab); y NR_002083 (snARN:U6:96Ac). Las Figuras 1A-1D y 2A-2D ilustran el impacto de la edad gestacional, la rotura prematura de las membranas (RPM)

y el parto prematuro espontáneo final en algunas de las secuencias rechazadas y el ARNm y miARN seleccionados para la normalización (véase Figuras 1D y 2D). En consecuencia, las SEQ ID NOs: 2-4 para miARN, y la SEQ ID NO 1 para el ARNm se pueden utilizar para las secuencias de normalización en general, y en particular para la normalización de los biomarcadores de PTB. Los cebadores y sondas para estas secuencias se pueden obtener fácilmente por un experto en la materia con esta solicitud. Por ejemplo, las secuencias para el cebador directo, cebador inverso y sonda para la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, para la secuencia de normalización de ARNm de PPIA) será: Cebador directo: GCTTTGGGTCCAGGAATGG - SEQ ID NO: 301; Cebador inverso: GTTGTCCACAGTCAGCAATGGT - SEQ ID NO: 302; y Sonda: AGACCAGCAAGAAGAT - SEQ ID NO: 303, que también se pueden considerar secuencias de normalización para la invención expuesta en el presente documento.

10

En una realización, se puede proporcionar un kit de normalización que incluye una o más de estas secuencias de normalización en formato de ácido nucleico, tal como ARN, ADN, o híbrido de ARN/ADN. Preferentemente, las secuencias del kit de normalización incluyen el complemento de las secuencias enumeradas en las SEQ ID NO: 1-4. También preferentemente, las secuencias del kit de normalización incluyen las secuencias expuestas en las SEQ ID NOs: 301-303 puesto que estas secuencias son complementarias a la SEQ ID NO 1. Además, el kit de normalización también se puede incluir en un kit de diagnóstico de PTB como se describe en este documento. El kit de normalización pueden incluir composiciones individuales que tienen una sola secuencia de normalización o una única composición puede incluir una, dos, tres, o las cuatro secuencias de normalización y/o sus cebadores y/o sondas. Cada secuencia puede estar en un ácido nucleico separado o varias secuencias pueden estar en un único ácido nucleico. Las secuencias de normalización se pueden proporcionar con o sin un marcador, como un marcador visual o radiomarcador. Las secuencias de normalización se pueden proporcionar en una tarjeta de PCR a medida o un dispositivo similar configurado para su uso en la detección y/o cuantificación y/o calificación de ácidos nucleicos, tarjeta o dispositivo similar que se pueden configurar como sistema Q-PCR de alto rendimiento en tiempo real. Uno o más puntos de muestra de una tarjeta de PCR a medida pueden tener una, dos, tres, o las cuatro secuencias de normalización y/o sus cebadores y/o sondas. Por ejemplo, la tarjeta de PCR puede tener un punto con una secuencia de normalización o un punto con hasta las cuatro secuencias de normalización y/o sus cebadores y/o sondas. Dicha tarjeta de PCR puede tener uno o más puntos de secuencias de normalización, puntos que pueden ser pocillos de reacción o similares. La tarjeta de PCR también puede tener puntos de ensayo que tienen los ácidos nucleicos a analizar. Por ejemplo, la tarjeta de PCR a medida se puede configurar como sistema ABI de PCR en tiempo real de alto rendimiento. La incorporación de estas secuencias de normalización en los diversos productos de tarjetas de PCR permite que se utilicen más fácilmente para las muestras derivadas de plasma, y en mediciones repetidas de ARNm de PLC y miARN de PLC u otro ácido nucleico de normalización.

En una realización, una secuencia de normalización puede ser un ácido nucleico que contiene o consiste en la secuencia. La secuencia de normalización puede ser idéntica a una de las SEQ ID NOs: 2-4 para miARN, y la SEQ ID NO 1 para el ARNm, así como las SEQ ID NOs: 301-303, o puede ser un complemento de la misma, codificante o no codificante, así como una secuencia que se hibrida con la misma en condiciones adecuadas. La secuencia de normalización puede tener complementariedad perfecta o superior a o aproximadamente el 95 % de complementariedad, superior a o aproximadamente el 90 % de complementariedad, superior a o aproximadamente el 85 % de complementariedad, o superior a o aproximadamente el 80 % de complementariedad. La complementariedad se puede considerar con respecto a un ácido nucleico en una muestra biológica o un ácido nucleico natural que se obtiene de la misma. La secuencia de normalización puede ser continua, o puede tener una o más protuberancias o desemparejamientos tras la hibridación. La secuencia de normalización también puede incluir una o más modificaciones químicas, tales como una modificación en el carbono 2'. La secuencia de normalización puede o puede no formar un extremo saliente tras la hibridación. La secuencia de normalización puede incluir una secuencia de aproximadamente 15 nucleótidos a la secuencia completa, de aproximadamente 16 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 18 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 22 nucleótidos en la secuencia de una de las SEQ ID NOs: 2-3 para miARN, y la SEQ ID 1 para ARNm. La secuencia de normalización puede incluir un segmento único de secuencia o un complemento de la misma de la secuencia completa que tiene una longitud como se ha descrito.

En una realización, la presente invención puede incluir un método de identificación de una secuencia de normalización, tal como una secuencia de normalización del embarazo. El método puede incluir la obtención de una pluralidad de secuencias de ARN de plasma libre (por ejemplo, PLC), ARNm de PLC, y/o miARN de PLC procedentes de una pluralidad de sujetos (por ejemplo, hombres o mujeres) antes de un estado de enfermedad particular (por ejemplo, nacimiento prematuro espontáneo en mujeres o cáncer de próstata en hombres, y sin limitación a ello). Cuando se trata de mujeres embarazadas, las secuencias se pueden obtener antes de o a las 32

semanas, 30 semanas, 28 semanas, 26 semanas, 24 semanas, 22 semanas, 20 semanas, 18 semanas, 16 o 12 semanas de gestación, y posiblemente incluso antes durante el embarazo. Una vez obtenidas, se pueden identificar una o más secuencias de ARNm de PLC y/o miARN de PLC que se encuentran inalteradas entre estados de enfermedad (por ejemplo, entre dos o más mujeres abocadas a parto prematuro espontáneo con menos de 32 5 semanas), y estas secuencias inalteradas se pueden determinar para que sean secuencias de normalización. Pueden darse diferentes estados de enfermedad antes de la aparición de una enfermedad y, a continuación después de la aparición de la enfermedad. Las secuencias identificadas se pueden analizar y se puede confirmar que son ARNm de PLC y/o miARN de PLC u otro ARN de PLC que se encuentran esencialmente inalteradas entre dos o más de las muestras. Se puede confirmar adicionalmente que las secuencias se encuentran inalteradas entre 10 las secuencias adicionales. Las secuencias inalteradas pueden ser secuencias de normalización como se describe en el presente documento.

Otra realización de un método de identificación de un ácido nucleico de normalización de PLC puede incluir la obtención de una pluralidad de secuencias de ARNm o miARN de plasma libre (por ejemplo, PLC) procedentes de 15 una pluralidad de mujeres no embarazadas o mujeres embarazadas antes de las 32 semanas, tal como entre aproximadamente las 12-32 semanas de gestación. Las secuencias pueden ser de una mujer que está o se queda embarazada o de una pluralidad de mujeres que están embarazadas, en las que una o más secuencias pueden ser de una mujer que se queda embarazada y que es susceptible de PTB. Una o más secuencias se pueden obtener incluso de después del nacimiento o después de un PTB. Después de obtenerlas, las secuencias se pueden analizar 20 con el fin de identificar una o más secuencias de ARNm o miARN de plasma libre de células inalteradas entre los diferentes estados del embarazo. Los diferentes estados del embarazo pueden darse entre dos o más mujeres, o entre mujeres no embarazadas y embarazadas, o entre el embarazo temprano (por ejemplo, antes de las 16 semanas), o al final del embarazo (por ejemplo, después de aproximadamente 16 semanas), o entre antes de la aparición de un síntoma que indica PTB o después de un síntoma que indica PTB, o entre el embarazo y que tiene o 25 ha tenido parto prematuro de menos de 32 semanas, o sus combinaciones. A continuación, las secuencias se pueden analizar con el fin de confirmar (por ejemplo, mediante Q-RT-PCR) que el ARNm o miARN de PLC se encuentran inalterados entre dos o más muestras que tienen las secuencias. El análisis puede ser entre diferentes mujeres o diferentes estados del embarazo. La presencia de una secuencia inalterada o la cantidad de secuencia es indicativa de que la secuencia puede ser una secuencia de normalización como se describe en el presente 30 documento.

En otra realización, un método de identificación de ácidos nucleicos de normalización de PLC o sus secuencias puede incluir: obtener una pluralidad de secuencias de ARNm de PLC o miARN de PLC procedentes de una pluralidad de mujeres que se encuentran entre las 16-28 semanas de gestación o antes del nacimiento o PTB; 35 identificar una o más secuencias de ARNm o miARN de PLC inalteradas entre dos o más mujeres que tienen, han tenido, o tendrán PTB con menos de 32 semanas; y confirmar, mediante Q-RT-PCR, que el ARNm o miARN de PLC permanece inalterado entre dos o más muestras de ARN de PLC y/o miARN de PLC de una o más mujeres que no están embarazadas, están embarazadas o dos o más mujeres que tienen, han tenido, o tendrán PTB con menos de 32 semanas. Además, se puede obtener una pluralidad de ARN de PLC de las mujeres después de tener un 40 nacimiento a término o un PTB.

En una realización, las secuencias inalteradas o posibles secuencias de normalización se pueden analizar mediante la confirmación de que las secuencias son secuencias inalteradas o de normalización entre muestras seleccionadas al azar. 45

En una realización, la presente invención incluye un método de cuantificación de ARN de PLC. Dicho método puede incluir proporcionar un ácido nucleico de normalización de PLC, y la comparación de una muestra de ARN en plasma purificado (ARN de PLC) de un sujeto con la secuencia de normalización de PLC, tal como un ácido nucleico que tiene la secuencia de normalización. Dicha comparación se puede usar entonces para determinar la cantidad de 50 ARN de PLC en la muestra y entre dos o más muestras. Por consiguiente, se pueden normalizar diferentes muestras de diferentes fuentes usando la secuencia de normalización de PLC. Para la cuantificación de ARN de PLC se pueden usar una, dos, tres, o cuatro de las diferentes secuencias de normalización y/o sus cebadores y/o sondas. El método de cuantificación de ARN de PLC se puede realizar esencialmente como se conoce o se desarrolla posteriormente mediante el uso de las secuencias de normalización descritas en este documento. 55

En otra realización, un método de normalización de ácidos nucleicos de normalización de PLC o sus secuencias puede incluir: obtener una pluralidad de secuencias de ARNm de PLC o miARN de PLC procedentes de una pluralidad de mujeres entre las 12 y 32 semanas o las 16-28 semanas de gestación o antes del nacimiento o PTB; proporcionar una o más secuencias de ARNm o miARN de PLC inalteradas entre dos o más mujeres que tienen, han 60

tenido, o tendrán PTB con menos de 32 semanas; y la normalización de las secuencias de ARNm o miARN de PLC con las secuencias conocidas de ARNm o miARN de PLC inalteradas.

En una realización, un método de normalización de secuencias de ARNm o miARN de PLC puede incluir la normalización con una o más de las SEQ ID NOs: 1-4 o un cebador y/o sonda de las mismas o las SEQ ID NOs: 301-303 mediante protocolos de normalización convencionales.

Los métodos descritos también pueden incluir la obtención de muestras que tienen ARN de un sujeto y el procesamiento de la muestra con el fin de obtener ARN de PLC.

10 SECUENCIAS BIOMARCADORAS DE PTB

Se puede utilizar la cuantificación de ácidos nucleicos biomarcadores de PTB (por ejemplo, ARN) extraídos de una muestra biológica con el fin de determinar si una mujer embarazada es susceptible, o no, de PTB. Por consiguiente, la identificación de biomarcadores de PTB puede ser importante a fin de diagnosticar la susceptibilidad a PTB o predecir PTB. La presente invención en general incluye nuevos biomarcadores de ARN y procesos para identificar biomarcadores de ARN en plasma, y el uso de los biomarcadores de ARN para identificar estados previos a enfermedad relacionados con el PTB. La presente invención puede utilizar biomarcadores de ARN asociados a estados de enfermedad del embarazo con el fin de predecir si una mujer embarazada puede desarrollar o es susceptible de desarrollar un estado de enfermedad particular que pueda causar parto prematuro. En general, los biomarcadores de PTB incluyen ácidos nucleicos que son ARN de PLC como se describe en el presente documento.

Los biomarcadores de ARN de PLC pueden incluir secuencias de ARN derivadas de la madre y del feto. Puesto que la activación del miometrio puede resultar en parto espontáneo, y puesto que la quiescencia del miometrio es un período genómicamente rico, se pueden utilizar los cambios en el transcriptoma de PLC (por ejemplo, transcriptoma de ARN) para predecir PTB espontáneo. Dicho cambio en el transcriptoma de PLC puede ser indicativo de PTB, independientemente de si el estímulo se origina en los compartimentos de la madre o del feto. Ahora se han identificado los biomarcadores de PTB en ARN de PLC y se proporcionan en la Lista de secuencias como SEQ ID NOs: 5-300. Estas secuencias biomarcadoras de PTB en ARN de PLC están involucradas en el proceso biológico y regulador del embarazo, y la modulación de estos biomarcadores de PTB en ARN de PLC puede ser un indicio de enfermedad. Además, la modulación de estos biomarcadores de PTB en ARN de PLC se puede usar para inhibir, prevenir o tratar una enfermedad asociada al ARNm o miARN particular del biomarcador de PTB en ARN de PLC.

Brevemente, se obtuvo ARNm de PLC a las 26-28 semanas de 5 mujeres seleccionadas al azar abocadas a PTB (por ejemplo, nacimiento < 32 semanas) sin rotura prematura de las membranas (es decir, parto prematuro, rotura prematura de las membranas), y de 5 mujeres de control con parto a término. En una 'Fase de descubrimiento' de identificación de ARNm de PLC, el ARN extraído se analizó en la matriz de expresión de un transcrito humano completo Affymetrix Human Whole-Transcript Expression y las secuencias de ARNm alteradas en mujeres abocadas a PTB se identificaron en base a un factor de cambio (por ejemplo, $\geq 1,5x$, un límite de corte convencional que se utiliza en ciencia) y el valor p de control ($p < 0,01$). El ARNm de PLC se ordenó por estrechez de la distribución (por ejemplo, el análisis Ingenuity Systems Pathway Analysis) puesto que una distribución estrecha es una característica muy deseable de la prueba para cualquier marcador seleccionado, en el que cuanto más estrecha sea la distribución de la enfermedad y la normal, menor es la superposición en las distribuciones de la población. De las 25.934 secuencias de ARN identificadas a formar parte del transcriptoma de PLC a las 26 semanas, 88 biomarcadores de PTB en ARNm de PLC estaban alterados en mujeres abocadas a PTB; 22 biomarcadores de PTB en ARNm de PLC (SEQ ID NO: 19-41) estaban regulados por aumento y 66 ARNm de PLC (SEQ ID NO: 42-106) estaban regulados por disminución. El mapeo genómico reveló que las secuencias marcadoras de PTB en ARNm de PLC estaban asociadas a la expresión, el crecimiento y la proliferación celular, el ciclo celular, la muerte celular, y el ensamblaje y la organización celular.

Los biomarcadores de PTB en ARN de PLC pueden incluir, pero no se limitan a, ARN no codificante, tal como miARN y snARN y snoARN, y otros son ARNm. En una realización, los biomarcadores de PTB en ARN de PLC pueden incluir un biomarcador que indica susceptibilidad a PTB. Estos biomarcadores de PTB en ARN de PLC pueden incluir: (SEQ ID NO: 19) *taspasa de Homo sapiens*, aspartasa treonina, 1 (TASP1), ARNm, número de acceso NM_017714; (SEQ ID NO: 20) proteína con dedos de zinc 99 de *Homo sapiens* (ZNF99), ARNm, números de acceso NM_001080409 y XM_001132267; (SEQ ID NO: 21) ADNc FLJ16171 fis de *Homo sapiens*, clon BRHIP2003272, número de acceso AK131247; (SEQ ID NO: 22) islotes de regeneración de derivadas de gamma 3 de *Homo sapiens* (REG3G), variante de transcripción 1, ARNm, número de acceso NM_001008387; (SEQ ID NO: 23) receptor olfativo de *Homo sapiens*, familia 51, subfamilia A, miembro 2 (OR51A2), ARNm, números de acceso

NM_001004748 y XM_377159; (SEQ ID NO: 24) NADH deshidrogenasa de *Homo sapiens* (ubiquinona) subcomplejo 1 alfa, 2,8 kDa (NDUFA2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcripción 1, ARNm, número de acceso NM_002488; (SEQ ID NO: 25) factor de empalme 3a de *Homo sapiens*, subunidad 3, 60 kDa (SF3A3), ARNm, número de acceso NM_006802; (SEQ ID NO: 26) envoltura córnea tardía 2A de *Homo sapiens* (LCE2A), ARNm, número de acceso NM_178428; (SEQ ID NO: 27) proteína A14 de unión a calcio S100 de *Homo sapiens* (S100A14), ARNm, número de acceso NM_020672; (SEQ ID NO: 28) antígeno epitelial transmembrana seis de próstata 1 de *Homo sapiens* (STEAP1), ARNm, números de acceso NM_012449 y XM_940149; (SEQ ID NO: 29) ADNc FLJ11733 fis de *Homo sapiens*, clon HEMBA1005426, número de acceso AK021795; (SEQ ID NO: 30) homólogo rápido E1 de *Homo sapiens* (*Xenopus laevis*) (SPDYE1), ARNm, números de acceso NM_175064, XM_938448, XM_943679, XM_943682, XM_943684, XM_943688, y XM_943692; (SEQ ID NO: 31) tripartito que contiene el motivo 48 de *Homo sapiens* (TRIM48), ARNm, número de acceso NM_024114; (SEQ ID NO: 32) ARN 152 codificante no proteico de *Homo sapiens* (NCRNA00152), variante de transcripción 1, ARN no codificante, números de acceso NR_024204, XR_042051, y XR_042052; (SEQ ID NO: 33) ADNc FLJ39739 fis de *Homo sapiens*, clon SMINT2016440, número de acceso AK097058; (SEQ ID NO: 34) dominio FXYD que contiene el regulador de transporte de iones 2 de *Homo sapiens* (FXYD2), transcripción de la variante c, ARNm, número de acceso NM_001127489; (SEQ ID NO: 35) marco de lectura abierto 104 del cromosoma 1 de *Homo sapiens*, ARNm (clon de ADNc MGC: 70363 IMAGE: 5183308), cds completos, número de acceso BC062571; (SEQ ID NO: 36) fosfoserina aminotransferasa 1 de *Homo sapiens* (PSAT1), variante de transcripción 1, ARNm, número de acceso NM_058179; (SEQ ID NO: 37) KIAA1274 de *Homo sapiens* (KIAA1274), ARNm, números de acceso NM_014431 y XM_166125; (SEQ ID NO: 38) receptor del sabor de *Homo sapiens*, tipo 2, miembro 10 (TAS2R10), ARNm, número de acceso NM_023921; (SEQ ID NO: 39) proteína ribosomal S20 de *Homo sapiens* (RPS20), variante de transcripción 2, ARNm, número de acceso NM_001023; (SEQ ID NO: 40) glicerol-3-fosfato aciltransferasa 2 de *Homo sapiens*, mitocondrial (GPAT2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm, número de acceso NM_207328; (SEQ ID NO: 41) proteína hipotética LOC643008 de *Homo sapiens* (LOC643008), variante de transcripción 1, ARNm, números de acceso NM_001162995 y NR_024379; (SEQ ID NO: 42) proteína 6-2 asociada a queratina de *Homo sapiens* (KRTAP6-2), ARNm, número de acceso NM_181604; (SEQ ID NO: 43) saitoquina de *Homo sapiens* (STH), ARNm, número de acceso NM_001007532; (SEQ ID NO: 44) receptor olfativo de *Homo sapiens*, familia 2, subfamilia A, miembro 2 (OR2A2), ARNm, número de acceso NM_001005480 y XM_498253; (SEQ ID NO: 45) proteinasa 3 de *Homo sapiens* (PRTN3), ARNm, número de acceso NM_002777; (SEQ ID NO: 46) beta-1-glicoproteína 9 específica del embarazo de *Homo sapiens* (PSG9), ARNm, número de acceso NM_002784; (SEQ ID NO: 47) activador 2B de la guanilato ciclasa de *Homo sapiens* (uroguanilina) (GUCA2B), ARNm, número de acceso NM_007102; (SEQ ID NO: 48) dominio armadillo que contiene 10 repeticiones de *Homo sapiens* (ARMC10), variante de transcripción A, ARNm, número de acceso NM_031905; (SEQ ID NO: 49) marco de lectura abierto 59 del cromosoma 11 de *Homo sapiens* (C11orf59), ARNm, número de acceso NM_017907; (SEQ ID NO: 50) dominio 10 que contiene hélice superenrollada-hélice superenrollada de *Homo sapiens*, (CHCHD10), ARNm, número de acceso NM_213720; (SEQ ID NO: 51) dominio 2 que contiene 2-oxoglutarato y oxigenasa dependiente de hierro de *Homo sapiens* (OGFOD2), ARNm, número de acceso NM_024623; (SEQ ID NO: 52) biogénesis de orgánulos lisosomales del complejo-1 de *Homo sapiens*, subunidad 1 (BLOC1S1), ARNm, número de acceso NM_001487; (SEQ ID NO: 53) apolipoproteína AI de *Homo sapiens* (APOA1), ARNm, número de acceso NM_000039; (SEQ ID NO: 54) molécula CD3e, épsilon de *Homo sapiens* (complejo CD3-TCR) (CD3e), ARNm, número de acceso NM_000733; (SEQ ID NO: 55) proteína asociada a la diferenciación de queratinocitos de *Homo sapiens* (KRTDAP), ARNm, número de acceso NM_207392; (SEQ ID NO: 56) dominio 1 que contiene PDZ de *Homo sapiens* (PDZK1), ARNm, números de acceso NM_002614, XM_936907, XM_943050, XM_943061, y XM_943068; (SEQ ID NO: 57) N-acetiltransferasa 14 de *Homo sapiens* (relacionada con GCN5, putativa) (NAT14), ARNm, número de acceso NM_020378; (SEQ ID NO: 58) queratina 17 de *Homo sapiens* (KRT17), ARNm, número de acceso NM_000422; (SEQ ID NO: 59) proteína 1 de unión a la proteína ribosomal S19 de *Homo sapiens* (RPS19BP1), ARNm, números de acceso NM_194326 y XM_039373; (SEQ ID NO: 60) proteína transmembrana 188 de *Homo sapiens* (TMEM188), ARNm, número de acceso NM_153261; (SEQ ID NO: 61) proteína 2 (CSRP2) rica en cisteína y glicina de *Homo sapiens*, ARNm, número de acceso NM_001321; (SEQ ID NO: 62) receptor olfativo de *Homo sapiens*, familia 4, subfamilia D, miembro 1 (OR4D1), ARNm, números de acceso NM_012374 y XM_292627; (SEQ ID NO: 63) proteína ribosomal L8 de *Homo sapiens* (RPL8), variante de transcripción 1, ARNm, número de acceso NM_000973; (SEQ ID NO: 64) superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral de *Homo sapiens*, miembro 13C (TNFRSF13C), ARNm, número de acceso NM_052945; (SEQ ID NO: 65) proteína ribosomal mitocondrial S21 de *Homo sapiens* (MRPS21), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcripción 2, ARNm, número de acceso NM_018997; (SEQ ID NO: 66) apolipoproteína A-IV de *Homo sapiens* (ApoA4), ARNm, número de acceso NM_000482; (SEQ ID NO: 67) proteína 1 de unión del retículo sarcoplásmico de *Homo sapiens* (JSRP1), ARNm, número de acceso NM_144616; (SEQ ID NO: 68) subunidad 2 del activador de proteasoma (prosoma, macropain) de *Homo sapiens* (PA28 beta) (psme2), ARNm, número de acceso NM_002818; (SEQ ID NO: 69) dominio BTB 5 y que contiene dedos de zinc de *Homo sapiens* (ZBTB5), ARNm, número de acceso NM_014872 y

- XM_376832; (SEQ ID NO: 70) marco de lectura abierto 95 del cromosoma 10 de *Homo sapiens*, ARNm (clon de ADNc MGC: 161737 IMAGE: 8992175), cds completos, número de acceso, BC126459; (SEQ ID NO: 71) nicotinamida fosforribosiltransferasa de *Homo sapiens* (NAMPT), ARNm, número de acceso NM_005746; (SEQ ID NO: 72) receptor 6 asociado a trazas de amina de *Homo sapiens* (TAAR6), ARNm, número de acceso, NM_175067;
- 5 (SEQ ID NO: 73) miosina de *Homo sapiens*, cadena ligera 6, alcalina, músculo liso y no muscular (MYL6), variante de transcripción 1, ARNm, números de acceso NM_021019 y NM_079424; (SEQ ID NO: 74) ATP sintasa de *Homo sapiens*, transporte de H⁺, complejo Fo mitocondrial, subunidad C2 (subunidad 9) (ATP5G2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcripción 2, ARNm, número de acceso NM_005176; (SEQ ID NO: 75) familia 18 con similitud de secuencia de *Homo sapiens*, miembro B2 (FAM18B2), variante de transcripción 1,
- 10 ARNm, números de acceso NM_145301 y XM_936923; (SEQ ID NO: 76) factor de transcripción Sp6 de *Homo sapiens* (SP6), ARNm, números de acceso NM_199262 y XM_292621; (SEQ ID NO: 77) formina invertida de *Homo sapiens*, dominio que contiene FH2 y WH2 (INF2), variante de transcripción 1, ARNm, número de acceso NM_022489; (SEQ ID NO: 78) inhibidor de la disociación de Rho PIB de *Homo sapiens* (GDI) alfa (ARHGDI), variante de transcripción 2, ARNm, número de acceso NM_004309; (SEQ ID NO: 79) dominio OTU que contiene 6A
- 15 de *Homo sapiens* (OTUD6A), ARNm, número de acceso NM_207320; (SEQ ID NO: 80) dominio BTB 12 y que contiene dedos de zinc de *Homo sapiens* (ZBTB12), ARNm, número de acceso NM_181842; (SEQ ID NO: 81) proteína 2B organizadora del huso mitótico de *Homo sapiens* (MZT2B), ARNm, número de acceso NM_025029; (SEQ ID NO: 82) receptor olfativo de *Homo sapiens*, familia 52, subfamilia E, miembro 2 (OR52E2), ARNm, número de acceso NM_001005164 y XM_061610; (SEQ ID NO: 83) LOC150622 hipotética de *Homo sapiens* (LOC150622),
- 20 ARN no codificante, número de acceso NR_026832, XR_041760, XR_041761, y XR_041762; (SEQ ID NO: 84) selenofosfato sintetasa 1 de *Homo sapiens* (SEPHS1), variante de transcripción 1, ARNm, número de acceso NM_012247; (SEQ ID NO: 85) barrera para el factor de autointegración 1 de *Homo sapiens* (BANF1), variante de transcripción 1, ARNm, número de acceso NM_003860; (SEQ ID NO: 86) factor de transcripción general IIB de *Homo sapiens* (GTF2B), ARNm, número de acceso NM_001514; (SEQ ID NO: 87) familia del dominio RGM de
- 25 *Homo sapiens*, miembro A (RGMA), variante de transcripción 4, ARNm, número de acceso NM_020211; (SEQ ID NO: 88) receptor de la hormona de liberación de prolactina de *Homo sapiens* (PRLHR), ARNm, número de acceso NM_004248 y NM_005287; (SEQ ID NO: 89) pseudogen 2 similar a dpy-19 de *Homo sapiens* (*C. elegans*) (DPY19L2P2), variante de transcripción 2, no codificante de ARN, número de acceso NR_003561; (SEQ ID NO: 90) regulador de la diferenciación celular glial, meteorina de *Homo sapiens* (METRN), ARNm, número de acceso
- 30 NM_024042; (SEQ ID NO: 91) receptor de ácido graso libre 1 de *Homo sapiens* (FFAR1), ARNm, número de acceso NM_005303; (SEQ ID NO: 92) péptido natriurético B de *Homo sapiens* (NPPB), ARNm, número de acceso NM_002521; (SEQ ID NO: 93) proteína 3 de interacción BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa de *Homo sapiens* (BNIP3), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm, número de acceso NM_004052; (SEQ ID NO: 94) familia hélice-bucle-hélice básica de *Homo sapiens*, miembro a15 (BHLHA15), ARNm, número de acceso NM_177455;
- 35 (SEQ ID NO: 95) virus del sarcoma murino Finkel-Biskis-Reilly de *Homo sapiens* (FBR-MuSV) expresado ubicuamente (FAU), ARNm, número de acceso NM_001997; (SEQ ID NO: 96) marco de lectura abierto 70 del cromosoma 9 de *Homo sapiens* (C9orf70), ARN no codificante, número de acceso NR_026663 y XM_001721481 XM_001723928 XM_001724353; (SEQ ID NO: 97) proteína ribosomal L30 de *Homo sapiens* (RPL30), ARNm, número de acceso NM_000989; (SEQ ID NO: 98) regulador semejante a la diferenciación celular glial, meteorina de
- 40 *Homo sapiens* (METRNL), ARNm, número de acceso NM_001004431 y XM_209073; (SEQ ID NO: 99) semejante a la ubiquitina 5 de *Homo sapiens* (UBL5), variante de transcripción 1, ARNm, número de acceso NM_024292; (SEQ ID NO: 100) canal de rectificación de potasio hacia el interior de *Homo sapiens*, subfamilia J, miembro 4, (KCNJ4), variante de transcripción 1, ARNm, número de acceso NM_152868; (SEQ ID NO: 101) polipéptido naciente asociado a la subunidad alfa del complejo de *Homo sapiens* (NACA), variante de transcripción 1, ARNm, número de acceso
- 45 NM_001113203; (SEQ ID NO: 102) factor 2 rico en EDRK pequeñas de *Homo sapiens* (SERF2), ARNm, número de acceso NM_001018108; (SEQ ID NO: 103) familia de sulfotransferasa citosólica 1A con preferencia por fenol, miembro 2, de *Homo sapiens*, (SULT1A2), variante de transcripción 2, ARNm, número de acceso NM_177528; (SEQ ID NO: 104) receptor olfativo de *Homo sapiens*, familia 51, subfamilia G, miembro 2 (OR51G2), ARNm, número de acceso NM_001005238; (SEQ ID NO: 105) factor de transcripción básico 3 de *Homo sapiens* (BTF3), variante de
- 50 transcripción 1, ARNm, número de acceso NM_001037637; y (SEQ ID NO: 106) LSM10 de *Homo sapiens*, asociado a ARN U7 nuclear pequeño (LSM10), ARNm, número de acceso NM_032881.

En una realización, los biomarcadores de PTB en ARN de PLC pueden incluir un marcador biológico que está regulado por aumento a fin de indicar la susceptibilidad al PTB con las SEQ ID NO: 107-142, en las que el Probeset

55 ID, los números de acceso, los símbolos de genes, y sus secuencias de inicio y detención se incorporan en este documento por referencia específica:

ES 2 586 153 T3

SEQ ID NO:	#	Probeset ID	Símbolo del gen	RefSeq (Acceso)	Seqname	Inicio	Detención
SEQ ID NO:	107	2391026	C1orf159	BC008788	chr1	1020631	1020674
SEQ ID NO:	108	2465373	AHCTF1	NM_015446	chr1	247063497	247063521
SEQ ID NO:	109	2321026	C1orf158	NM_152290	chr1	12821062	12821086
SEQ ID NO:	110	2370564	CACNA1E	NM_000721	chr1	181705411	181705435
SEQ ID NO:	111	2445415	ASTN1	NM_004319	chr1	176927594	176927618
SEQ ID NO:	112	2383404	ADCK3	NM_020247	chr1	227165195	227165219
SEQ ID NO:	113	3314648	C10orf92	BC034223	chr10	134628211	134628236
SEQ ID NO:	114	3332991	C11orf66	NM_145017	chr11	61257978	61258037
SEQ ID NO:	115	3377201	CDC42BPG	NM_017525	chr11	64601758	64601797
SEQ ID NO:	116	3381279	ARAP1	BC056401	chr11	72411090	72411124
SEQ ID NO:	117	3403055	ATN1	NM_001007026	chr12	7045236	7045261
SEQ ID NO:	118	3655114	CD19	NM_001178098	chr16	28943903	28943933
SEQ ID NO:	119	3739970	ABR	NM_021962	chr17	913969	913994
SEQ ID NO:	120	3774020	C17orf70	NR_033338	chr17	79518798	79518881
SEQ ID NO:	121	3774725	CCDC57	ENST00000324808	chr17	80109446	80109470
SEQ ID NO:	122	3741735	CAMKK1	AF370377	chr17	3773035	3773059

ES 2 586 153 T3

NO:							
SEQ ID NO:	123	3830886	ARHGAP33	NM_052948	chr19	36273687	36273769
SEQ ID NO:	124	3835887	APOE	NM_000041	chr19	45412388	45412412
SEQ ID NO:	125	3866306	AP2S1	NM_004069	chr19	47342008	47342032
SEQ ID NO:	126	2546857	CAPN13	NM_144575	chr2	30993219	30993282
SEQ ID NO:	127	2576644	C2orf27B	BC043584	chr2	132552867	132552917
EQ ID NO:	128	2546826	CAPN13	NM_144575	chr2	30961299 ...	30961323
SEQ ID NO:	129	2708707	C3orf70	NM_001025266	chr3	184870647 ...	184870677
SEQ ID NO:	130	2622179	BSN	NM_003458	chr3	49699843	49699867
SEQ ID NO:	131	2870730	BCLAF1	NM_014739	chr5	110285528	110285604
SEQ ID NO:	132	2902959	C4A	ENST00000428956	chr6	31949811	31949835
SEQ ID NO:	133	2953468	C6orf130	ENST00000488238	chr6	41043021	41043070
SEQ ID NO:	134	3031798	ABCB8	NM_007188	chr7	150744493	150744517
SEQ ID NO:	135	3039763	ANKMY2	NM_020319	chr7	16666684	16666799
SEQ ID NO:	136	3023426	AHCYL2	NM_001130723	chr7	129008311	129008335
SEQ ID NO:	137	3031951	AGAP3	NM_031946	chr7	150841064	150841088
SEQ ID NO:	138	3031944	AGAP3	AL442089	chr7	150838958	150838982

ES 2 586 153 T3

SEQ ID NO:	139	3206269	ATP5A1	NM_001001937	chr9	41799773	41799797
SEQ ID NO:	140	4001353	BEND2	NM_153346	chrX	18221855	18222031
SEQ ID NO:	141	3969900	CA5B	ENST00000479740	chrX	15768063	15768093
SEQ ID NO:	142	3966810	CD99P1	NR_033380	chrX	2541426	2541450

En una realización, los biomarcadores de PTB en ARN de PLC pueden incluir un marcador biológico que está regulado por disminución a fin de indicar la susceptibilidad al PTB.

SEQ ID NO	#	Probeset ID	Símbolo del gen	RefSeq (Acceso)	Seqname	Inicio	Detención
SEQ ID NO:	143	2434348	APH1A	AK125685	chr1	150239436	150239470
SEQ ID NO:	144	2347527	ABCD3	NM_001122674	chr1	94944215	94944239
SEQ ID NO:	145	2347504	ABCD3	NM_002858	chr1	194884035	94884129
SEQ ID NO:	146	2347024	CCDC18	NM_206886	chr1	193645587	93645967
SEQ ID NO:	147	2383766	ARF1	NM_001024227	chr1	228286406	228286440
SEQ ID NO:	148	2411671	AGBL4	ENST00000411952	chur1	49052585	49052609
SEQ ID NO:	149	2316059	ATAD3A	NM_018188	chur1	1469347	1469376
SEQ ID NO:	150	2391349	ACAP3	AB051503	chur1	1240376	1240469
SEQ ID NO:	151	2385702	C1orf57	NM_032324	chur1	233086457	233086481
SEQ ID NO:	152	2393833	C1orf174	NM_207356	chr1	3816811	3816835
SEQ ID NO:	153	2440696	B4GALT3	NM_003779	chr1	161147290	161147314

ES 2 586 153 T3

NO:							
SEQ ID	154	2383363	ADCK3	ENST00000366779	chr1	227096295	227096344
NO:							
SEQ ID	155	2318458	CAMTA1	NM_015215	chr1	6845541	6845635
NO:							
SEQ ID	156	2392132	C1orf86	ENST00000378545	chr1	2130199	2130245
NO:							
SEQ ID	157	2399312	ALDH4A1	NM_003748	chr1	19199312	19199336
NO:							
SEQ ID	158	3286039	CCNYL2	ENST00000345581	chr10	42965620	42965646
NO:							
SEQ ID	159	3282296	ACBD5	ENST00000375888	chr10	27529434	27529579
NO:							
SEQ ID	160	3261217	BTRC	NM_033637	chr10	103285926	103285955
NO:							
SEQ ID	161	3284165	C1D	NM_173177	chr10	32800666	32800698
NO:							
SEQ ID	162	3245187	ANXA8L2	NM_001630	chr10	47747028	47747107
NO:							
SEQ ID	163	3251356	ANAPC16	NM_173473	chr10	73975872	73975896
NO:							
SEQ ID	164	3380994	C11orf59	NM_017907	chr11	71814234	71814263
NO:							
SEQ ID	165	3353451	C11orf63	NM_024806	chr11	122774660	122774979
NO:							
SEQ ID	166	3370889	ALX4	NM_021926	chr11	44296901	44297069
NO:							
SEQ ID	167	3364964	ABCC8	NM_000352	chr11	17453766	17453791
NO:							
SEQ ID	168	3377365	BATF2	NM_138456	chr11	64757241	64757266
NO:							
SEQ ID	169	3351287	CD3E	NM_000733	chr11	118175668	118175692
NO:							

ES 2 586 153 T3

SEQ ID NO:	170	3323765	ANO5	NM_213599	chr11	22215039	22215069
SEQ ID NO:	171	3352074	CBL	NM_005188	chr11	119077128	119077154
SEQ ID NO:	172	3332702	CD6	NM_006725	chr11	60785827	60785851
SEQ ID NO:	173	3378518	C1QBP	NM_001212	chr11	66529422	66529450
SEQ ID NO:	174	3334998	CAPN1	NM_005186	chr11	64978760	64978949
SEQ ID NO:	175	3316546	AP2A2	NM_012305	chr11	1010548	1010572
SEQ ID NO:	176	3358122	C11orf35	NM_173573	chr11	556268	556374
SEQ ID NO:	177	3457551	ANKRD52	NM_173595	chr12	56631722	56631752
SEQ ID NO:	178	3440081	CACNA2D4	NM_172364	chr12	1909167	1909199
SEQ ID NO:	179	3431564	C12orf24	AK297684	chr12	110924538.	110924563
SEQ ID NO:	180	3434501	CABP1	NM_031205	chr12	121088358	121088431
SEQ ID NO:	181	3435685	ARL61P4	NM_018694	chr12	123466154	123466179
SEQ ID NO:	182	3413611	CACNB3	NM_000725	chr12	49212713	49212756
SEQ ID NO:	183	3523859	C13orf27	NM_138779	chr13	103418821	103418856
SEQ ID NO:	184	3573232	ALKBH1	NM_006020	chr14	78140155	78140183
SEQ ID NO:	185	3563711	C14orf138	NM_024558	chr14	50583243	50583268
SEQ ID NO:	186	3543628	C14orf169	NM_024644	chr14	73957998	73958031

ES 2 586 153 T3

NO:							
SEQ ID	187	3576909	ATXN3	NR_028453	chr14	92547321	92547345
NO:							
SEQ ID	188	3557166	ACIN1	NM_014977	chr14	23564322	23564348
NO:							
SEQ ID	189	3604597	ADAMTS7	NM_014272	chr15	82611989	82612090
NO:							
SEQ ID	190	3601544	CCDC33	NM_025055	chr15	74536429	74536486
NO:							
SEQ ID	191	3605931	ALPK3	NM_020778	chr15	85411431	85411647
NO:							
SEQ ID	192	3619410	C15orf52	NM_207380	chr15	40627985	40628027
NO:							
SEQ ID	193	3605398	ADAMTSL3	NM_207517	chr15	84324481	84324513
NO:							
SEQ ID	194	3636496	BTBD1	NM_025238	chr15	83735879	83735903
NO:							
SEQ ID	195	3628544	CA12	NM_001218	chr15	63637686	63637806
NO:							
SEQ ID	196	3601237	CD276	NM_001024736	chr15	73992032	73992056
NO:							
SEQ ID	197	3607736	C15orf42	NM_152259	chr15	90167064	90167094
NO:							
SEQ ID	198	3620776	CDAN1	NM_138477	chr15	43026443	43026535
NO:							
SEQ ID	199	3619407	C15orf52	NM_207380	chr15	40627389	40627585
NO:							
SEQ ID	200	3617732	ACT1	NM_005159	chr15	35084610	35084634
NO:							
SEQ ID	201	3619427	C15orf52	AK126485	chr15	40631674	40631701
NO:							
SEQ ID	202	3655082	ATP2A1	NM_173201	chr16	28909568	28909754
NO:							

ES 2 586 153 T3

SEQ ID NO:	203	3656848	BCKDK	NM_001122957	chr16	31123381	31123415
SEQ ID NO:	204	3695322	CDH16	NM_004062	chr16	66944302	66944327
SEQ ID NO:	205	3704743	ANKRD11	NM_013275	chr16	89351849	89352020
SEQ ID NO:	206	3662891	CCDC135	NM_032269	chr16	57738788	57738820
SEQ ID NO:	207	3687096	BOLA2	NM_001031827	chr16	30204743	30204770
SEQ ID NO:	208	3686627	APOB48R	NM_018690	chr16	28507548	28507572
SEQ ID NO:	209	3770812	CASKIN2	NM_020753	chr17	73499499	73499557
SEQ ID NO:	210	3767486	AXIN2	NM_004655	chr17	63533032	63533167
SEQ ID NO:	211	3742217	ALOX15	NM_001140	chr17	4535481	4535558
SEQ ID NO:	212	3742483	CAMTA2	NM_015099	chr17	4876890	4877042
SEQ ID NO:	213	3764300	BZRAP1	BX648763	chr17	56382268	56382298
SEQ ID NO:	214	3722682	C17orf88	NK_026770	chr17	41994608	41994632
SEQ ID NO:	215	3766544	CDd79B	NM_000626	chr17	62008702	62008726
SEQ ID NO:	216	3748962	ALDH3A1	NM_001135168	chr17	19641470	19641494
SEQ ID NO:	217	3774985	C17orf101	NR_033265	chr17	80350291	80350395
SEQ ID NO:	218	3764359	BZRAP1	NM_004758	chr17	56404109	56404137
SEQ ID NO:	219	3774706	CCDC57	NM_198082	chr17	80059693	80059731

ES 2 586 153 T3

NO:							
SEQ ID	220	3773685	AZI1	NM_014984	chr17	79172707	79172736
NO:							
SEQ ID	221	3773633	AATK	ENST00000417379	chr17	79105718	79105746
NO:							
SEQ ID	222	3848059	C3	NM_000064	chr19	6684786	6684810
NO:							
SEQ ID	223	3866980	CARD8	NM_001184900	chr19	48715191	48715220
NO:							
SEQ ID	224	3850462	AP1M2	NM_005498	chr19	10685580	10685611
NO:							
SEQ ID	225	3854387	ANO8	NM_020959	chr19	17439225	17439281
NO:							
SEQ ID	226	3837683	C19orf68	BC043386	chr19	48700487	48700516
NO:							
SEQ ID	227	3867278	CA11	NM_001217	chr19	49143358	49143452
NO:							
SEQ ID	228	3865986	CCDC8	NM_032040	chr19	46916087	46916262
NO:							
SEQ ID	229	3846260	C19orf28	NM_021731	chr19	3557104	3557128
NO:							
SEQ ID	230	3868520	ASPDH	NM_001114598	chr19	51014987	51015030
NO:							
SEQ ID	231	3860221	ALKBH6	NM_198867	chr19	36502307	36502333
NO:							
SEQ ID	232	3815214	AZU1	NM_001700	chr19	828320	82837371
NO:							
SEQ ID	233	3817205	ATCAY	NM_033064	chr19	3917745	3917775
NO:							
SEQ ID	234	3846377	APBA3	NM_004886	chr19	3754199	3754228
NO:							
SEQ ID	235	3830369	CD22	NM_001771	chr19	35823497	35823523
NO:							

ES 2 586 153 T3

SEQ ID NO:	236	3842076	BRSK1	NM_032430	chr19	55805471	5805501
SEQ ID NO:	237	3852137	CACNA1A	NM_000068	chr19	13318294	13318431
SEQ ID NO:	238	3824734	ARRDC2	NM_015683	chr19	18121452	18121479
SEQ ID NO:	239	3834055	AXL	NM_021913	chr19	41737096	41737140
SEQ ID NO:	240	3846299	C19orf29	NM_001080543	chr19	3613163	3613278
SEQ ID NO:	241	3836141	BLOC1S3	NM_212550	chr19	45683121	45683155
SEQ ID NO:	242	3832352	CATSPERG	NM_021185	chr19	38852853	38852886
SEQ ID NO:	243	3843980	A1BG-AS	BC040926	chr19	58864701	58864725
SEQ ID NO:	244	3846310	C19orf29	NM_001080543	chr19	3620730	3620754
SEQ ID NO:	245	3839117	ATF5	NM_012068	chr19	50436321	50436349
SEQ ID NO:	246	2521240	CCDC150	NM_001080539	chr2	197504344	197504405
SEQ ID NO:	247	2474325	C2orf28	NM_016085	chr2	27435237	27435334
SEQ ID NO:	248	2574650	BIN1	NM_139343	chr2	127808045	127808098
SEQ ID NO:	249	2473975	C2orf18	NM_017877	chr2	27001867	27001894
SEQ ID NO:	250	2500292	BCL2L11	AB071199	chr2	111887709	111887791
SEQ ID NO:	251	2505925	ARHGEF4	NM_015320	chr2	131804327	131804358
SEQ ID NO:	252	2532302	ALPPL2	NM_031313	chr2	233272604	233272635

ES 2 586 153 T3

NO:							
SEQ ID	253	2536644	BOK	NM_032515	chr2	242512472	242512497
NO:							
SEQ ID	254	2566556	C2orf55	NM_207362	chr2	99454585	99454610
NO:							
SEQ ID	255	2532289	ALPP	NM_001632	chr2	233246242	233246266
NO:							
SEQ ID	256	2604401	ARL4C	NM_005737	chr2	235404210	235404234
NO:							
SEQ ID	257	3874441	CDC25B	NM_021873	chr20	3776391	3776523
NO:							
SEQ ID	258	3882227	BPIL3	NM_174897	chr20	31625440	31625473
NO:							
SEQ ID	259	3894422	ANGPT4	NM_015985	chr20	865725	865751
NO:							
SEQ ID	260	3874383	ATRN	NM_139321	chr20	3614963	3615036
NO:							
SEQ ID	261	3892803	C20orf200	NR_033263	chr20	61142540	61142567
NO:							
SEQ ID	262	3914081	ARFRP1	NM_001134758	chr20	62331883	62331908
NO:							
SEQ ID	263	3882563	CBFA2T2	NM_005093	chr20	32194762	32194787
NO:							
SEQ ID	264	3907034	ADA	NM_000022	chr20	43280223	43280248
NO:							
SEQ ID	265	3926166	C21orf91	ENST00000405964	chr21	19191195	19191284
NO:							
SEQ ID	266	3932407	C21orf88	NR_026542	chr21	40984265	40984292
NO:							
SEQ ID	267	3922457	ABCG1	NM_016818	chr21	43639267	43639291
NO:							
SEQ ID	268	3918143	C21orf63	AK126660	chr21	33829548	33829572
NO:							

ES 2 586 153 T3

SEQ ID NO:	269	3951118	ACR	ENST00000216139	chr22	51176638	51176663
SEQ ID NO:	270	3946042	CACNA1I	NM_021096	chr22	40081973	40082331
SEQ ID NO:	271	3955347	C22orf13	ENST00000407973	chr22	24951587	24951829
SEQ ID NO:	272	2644874	BPESC1	NR_026783	chr3	138824138	138824168
SEQ ID NO:	273	2641457	CCDC48	NM_024768	chr3	128751742	128751767
SEQ ID NO:	274	2627379	C3orf49	NR_026866	chr3	63830699	63830723
SEQ ID NO:	275	2624738	CACNA2D3	NM_018398	chr3	54913057	54913081
SEQ ID NO:	276	2681152	C3orf64	AK304102	chr3	69062765	69062816
SEQ ID NO:	277	2687780	CD47	NM_001777	chr3	107769425	107769449
SEQ ID NO:	278	2719502	CC2D2A	NM_001080522	chr4	15504114	15504140
SEQ ID NO:	279	2852783	C1QTNF3	NM_030945	chr5	34033484	34033517
SEQ ID NO:	280	2881766	ANXA6	NM_001155	chr5	150496698	150496722
SEQ ID NO:	281	2842463	C5orf25	AK126204	chr5	175721931	175722032
SEQ ID NO:	282	2878396	APBB3	AK125244	chr5	139943698	139943736
SEQ ID NO:	283	4047621	BTNL8	NM_024850	chr5	180375920	180375946
SEQ ID NO:	284	2901692	ABCF1	NM_001025091	chr6 3	30545599	30545665
SEQ ID NO:	285	2973284	C6orf174	NM_001012279	chr61	127837554	127837578

ES 2 586 153 T3

NO:							
SEQ ID	286	2937603	C6orf70	NM_018341	chr6	170175406	170175442
NO:							
SEQ ID	287	2999777	AEBP1	NM_001129	chr7	44148891	44148940
NO:							
SEQ ID	288	3001005	ABCA13	NM_152701	chr7	18285460	48285484
NO:							
SEQ ID	289	3017084	ARMC10	NM_031905	chr7	102716226	102716250
NO:							
SEQ ID	290	3006668	AUTS2	NM_015570	chr7	69599533	69599557
NO:							
SEQ ID	291	3158462	C8ORFK29	NR_015428	chr8	145577092	145577180
NO:							
SEQ ID	292	3121027	C8orf33	NM_023080	chr8	146278059	146278089
NO:							
SEQ ID	293	3105606	CA2	ENST00000285379	chr8	86376123	86376148
NO:							
SEQ ID	294	3204670	CD72	ENST00000396759	chr9	35618756	35618361
NO:							
SEQ ID	295	3221925	AKNA	NM_030767	chr9	117103978	117104002
NO:							
SEQ ID	296	3223849	C5	NM_001735	chr9	123812463	123812487
NO:							
SEQ ID	297	3190991	C9orf106	NM_001012715	chr9	132083295	132083325
NO:							
SEQ ID	298	3222599	ASTN2	NM_198186	chr9	119449350	119449382
NO:							
SEQ ID	299	3229062	BRD3	NM_007371	chr9	136905156	136905186
NO:							
SEQ ID	300	3986675	ATG4A	ENST00000457035	chrX	107335082	107335109
NO:							

Se llevó a cabo una investigación para determinar si los biomarcadores de PTB podrían ser específicos de miARN o no. El mismo ARN total extraído de las muestras de la semana 26-28, descritas anteriormente, se analizó en la matriz de ARN pequeño no codificante Affymetrix GeneChip (por ejemplo, 847 ARN humanos pequeños no

codificantes incluyendo miARN, siARN, snARN, snoARN, etc), y solo miARN alterado en mujeres abocadas a PTB se identificaron por un factor de cambio (por ejemplo, $\geq 1,5x$) y el valor p de control ($p < 0,01$). Los miARN se ordenaron por la estrechez de la distribución (por ejemplo, la herramienta Affymetrix miRNA QC Tool y análisis Ingenuity Systems Pathway Analysis). De los 847 ARN pequeños no codificantes, solo 14 estaban alterados a las 26 semanas en mujeres abocadas a PTB; 3 miARN de PLC habían aumentado o estaban regulados por aumento (por ejemplo, miARN-548L (SEQ ID NO: 5), miARN-99A (SEQ ID NO: 6), y miARN-99b (SEQ ID NO: 7)); y 10 miARN de PLC habían disminuido o estaban regulados por disminución (por ejemplo, miARN-382 (SEQ ID NO: 8), miARN-491 (SEQ ID NO: 9), miARN-214 (SEQ ID NO: 10), miARN-31 (SEQ ID NO: 11), miARN-342 (SEQ ID NO: 12), miARN-let-7 g (SEQ ID NO: 13), miARN-194-1 (SEQ ID NO: 14), miARN-194-2 (SEQ ID NO: 15), miARN 92b (SEQ ID NO: 16), miARN 320b-1 (SEQ ID NO: 17), y miARN 320b-2 (SEQ ID NO: 18). El mapeo genómico reveló que los miARN marcadores de PTB estaban asociados a la regulación celular, a la disfunción, la contractilidad y la inflamación de los músculos.

Ninguno se ha descrito anteriormente en el embarazo y solo unos pocos se han relacionado previamente con los tejidos reproductivos. Puesto que el miARN reduce la transcripción y/o traducción y se reducen 11 de 14 miARN afectados, los hallazgos pueden explicar el proceso de activación del miometrio que debe preceder al PTB. El hecho de que el patrón de cambio miARN variase entre las mujeres con PTB sugiere que los patrones pueden reflejar el mecanismo subyacente que causa el PTB.

En una realización, los biomarcadores de PTB en miARN de PLC pueden incluir un marcador biológico que aumenta a fin de indicar la susceptibilidad a PTB. Estos biomarcadores de PTB en miARN de PLC crecientes pueden incluir: miARN-548L (SEQ ID NO: 5), véase número de acceso NR_031630; miARN-99a (SEQ ID NO: 6), véase número de acceso NR_029514; y miARN-99b (SEQ ID NO: 7), véase número de acceso NR-029843.

En una realización, los biomarcadores de PTB en miARN de PLC pueden incluir un biomarcador que disminuye a fin de indicar la susceptibilidad a PTB. Estos biomarcadores de PTB en miARN de PLC decrecientes pueden incluir: miARN-382 (SEQ ID NO: 8), número de acceso NR_029874; miARN-491 (SEQ ID NO: 9), número de acceso NR_030166; miARN-214 (SEQ ID NO: 10), número de acceso NR_029627; miARN-31 (SEQ ID NO: 11), número de acceso NR_029505; miARN-342 (SEQ ID NO: 12), número de acceso NR_029888; miARN-let-7 g (SEQ ID NO: 13), número de acceso NR_029660; miARN-194-1 (SEQ ID NO: 14), número de acceso NR_029711; miARN-194-2 (SEQ ID NO: 15), número de acceso NR_029829; miARN 92b (SEQ ID NO: 16), número de acceso NR_030281; miARN 320b-1 (SEQ ID NO: 17), número de acceso NR_031564; y miARN 320b-2 (SEQ ID NO: 18), número de acceso NR_0315748.

También se llevó a cabo una investigación para determinar el patrón de miARN que se alteran con tan solo 16 semanas en mujeres abocadas a PTB. La validación de los resultados de la matriz se llevó a cabo por PCR en tiempo real de alto rendimiento. Brevemente, 3 miARN que se incrementaron, 7 miARN que se redujeron, respectivamente, a las 26 semanas en mujeres abocadas a PTB espontáneo, y se llevó a cabo Q-RT-PCR y los miARN se normalizaron con las secuencias de normalización mencionadas en el presente documento. La Figura 3 confirma que 10/14 de los resultados de la matriz de miARN estaban alterados significativamente en los niveles de biomarcador de PTB en miARN de plasma libre de células a las 26 semanas en mujeres abocadas a PTB. También se comprobó que la edad gestacional afecta al nivel de miARN de PLC. Los estudios de PCR se ampliaron a todas las muestras quincenales disponibles para estos mismos embarazos, y los resultados de la PCR se normalizaron con las secuencias de normalización (por ejemplo, la secuencia de normalización de miARN). La Figura 4A indica que los niveles de miARN-548L se alteran solamente a principios del 2º trimestre, y la Figura 4B ilustra que el miARN-99a se incrementa de manera significativa a las 16 semanas de gestación, lo que plantea la posibilidad de una primera ventana de prueba tardía. Esto indica que la prueba se puede realizar con tan solo 12 semanas, 10 semanas, y posiblemente incluso antes. Es decir, la prueba de diagnóstico se puede implementar tan pronto como los biomarcadores de PTB en ARN de PLC se modulen en la mujer embarazada.

Para completar simultáneamente la validación de los cerca de 296 biomarcadores de PTB en ARN de PLC y cuantificar sus niveles en toda la gestación, se diseñó una tarjeta de PCR con cebadores diseñados a medida para amplificar los biomarcadores de PTB en miARN de PLC y las secuencias de normalización de miARN (por ejemplo, una tarjeta de Applied Biosciences Taqman precargada con cebadores diseñados a medida para los biomarcadores de PTB en miARN de PLC identificados y las secuencias de miARN de normalización, en el que los cebadores se pueden determinar fácilmente a partir de las secuencias de la Lista de secuencias por medio de técnicas convencionales, y pueden abarcar cebadores de baja rigurosidad, de rigurosidad media y de alta rigurosidad, y por tanto se pueden modificar las secuencias de cebador que sean útiles dentro de las secuencias proporcionadas en el Listado de secuencias). Esta tarjeta de PCR utiliza la tecnología microfluídica de alto rendimiento y permite un

máximo de 384 pocillos de Q-RT-PCR con cebadores anidados diseñados a medida tales como los biomarcadores de PTB en miARN de PLC y las secuencias de normalización. Se supone que su comercialización dará lugar a la fabricación de tarjetas grandes y la presente invención no se limita a las dimensiones existentes. Cada tarjeta requiere solo 50 ng de miARN total. Las tarjetas se diseñaron para dar cabida a múltiples muestras. Después el ARN de PLC aislado se aplicó a la tarjeta de miARN de PTB a medida con el fin de validar la matriz de miARN. Ese resultado se muestra en la Figura 3. Con un tamaño de 6 muestras por grupo, se validaron los resultados de micromatrices para 10 de los 14 marcadores de miARN de PTB. Los símbolos de miARN se muestran como en la Figura 3.

10 En una realización, la presente invención incluye un método de determinación de un cebador o una sonda para un biomarcador de PTB en ARN de PLC. Dicho método puede incluir el análisis de una o más de las secuencias de la Lista de secuencias con las SEQ ID NO: 5-300 y por tanto la determinación de una secuencia diana específica única o suficientemente única que es útil como cebador o sonda. Los cebadores se pueden determinar fácilmente a partir de las secuencias de la Lista de secuencias por medio de técnicas convencionales, y pueden abarcar cebadores de
 15 baja rigurosidad, de rigurosidad media y de alta rigurosidad, y por lo tanto se pueden modificar las secuencias de cebadores que sean útiles dentro de las secuencias proporcionadas en la Lista de secuencias.

Aunque todos estos biomarcadores de PTB en ARN de PLC proceden de seres humanos, en la práctica veterinaria también se pueden comprobar y utilizar otros biomarcadores de otros animales.

20 En una realización, los biomarcadores de PTB en ARN de PLC se pueden usar para predecir si una mujer está abocada o es susceptible de PTB, o no. Esta determinación se puede realizar mediante un análisis de sangre al menos tan pronto como a las 12 o 16 semanas de gestación. Además, este mismo proceso se puede aplicar a mujeres con gestación múltiple con los mismos marcadores. Sin embargo, se pueden identificar una serie de
 25 marcadores únicos recién obtenidos aplicables solamente a mellizos. En consecuencia, los biomarcadores de ARN de PLC identificados en este documento se pueden combinar en un algoritmo matemático que puede predecir la probabilidad de nacimiento prematuro. Como parece que hay múltiples vías que conducen a parto prematuro, el algoritmo también se puede utilizar para determinar el mecanismo que causa el PTB en una mujer determinada. Las matemáticas para crear el algoritmo son conocidas y no está patentada. Dicho algoritmo para predecir el PTB se
 30 puede ejecutar en un sistema informático, y se puede configurar como *software* y/o *hardware*. Los datos se pueden introducir en el sistema informático a fin de operar y optimizar el algoritmo de predicción de PTB.

En una realización, la presente invención puede incluir un método para predecir PTB en una mujer embarazada con un feto. Dicho método puede incluir la determinación de un cambio en el transcriptoma de ARN de PLC de una
 35 madre embarazada, en el que el cambio es predictivo de parto prematuro por parte de la madre embarazada. Dicha predicción de parto prematuro puede incluir la extracción y aislamiento de ARN a partir de un fluido corporal de la madre embarazada con menos de 32 semanas (por ejemplo, de 26-28 semanas, o de tan solo 12 semanas) de embarazo. El ARN aislado se puede utilizar para determinar un cambio en la cantidad de ARN (por ejemplo, al menos un factor de cambio, tal como $\geq 1,5x$) en el transcriptoma de ARN de PLC de la madre embarazada, en el que
 40 el cambio es predictivo de parto prematuro por parte de la madre embarazada.

En una realización, la presente invención proporciona un método para predecir el parto prematuro en una mujer embarazada de mellizos. Dicho método de predicción de PTB de mellizos puede incluir la determinación de un
 45 cambio en el transcriptoma de ARN de PLC de la mujer embarazada, en el que el cambio es predictivo de parto prematuro por parte de la madre embarazada. Este método puede incluir la extracción y aislamiento de ARN a partir de un fluido corporal de la madre embarazada con menos de 32 semanas (por ejemplo, de 26-28 semanas, o tan solo 12 semanas) de embarazo. El ARN aislado se puede utilizar para determinar un cambio (por ejemplo, al menos un factor de cambio, tal como $\geq 1,5x$) en el transcriptoma de ARN de PLC de la madre embarazada, en el que el
 50 cambio es predictivo de parto prematuro por parte de la madre embarazada.

En una realización, la presente invención puede incluir un método para predecir un estado de enfermedad en el embarazo. Dicho método puede incluir la determinación de un cambio en el transcriptoma de ARN de PLC de una
 madre embarazada, en el que el cambio es predictivo de un estado de enfermedad en el embarazo. El método puede incluir la extracción y aislamiento de ARN a partir de un fluido corporal de la madre embarazada con menos
 55 de 32 semanas (por ejemplo, de 26-28 semanas, o tan solo 12 semanas) de embarazo. El ARN aislado se puede utilizar para determinar un cambio (por ejemplo, al menos un factor de cambio, tal como $\geq 1,5x$) en el transcriptoma de ARN de PLC de la madre embarazada, en el que el cambio es predictivo de un estado de enfermedad en el embarazo. Por ejemplo, el estado de enfermedad en el embarazo puede ser mala placentación, restricción del crecimiento fetal, preeclampsia o anomalías en el feto.

En una realización, se puede aplicar un método para predecir el parto prematuro mediante el uso de los biomarcadores de PTB en ARN de PLC. Dicho método puede incluir la determinación de un cambio en un transcriptoma de ARN de PLC de una madre embarazada, en el que el cambio es predictivo de parto prematuro por parte de la madre embarazada. Además, el método puede incluir la extracción y el aislamiento de ARN de PLC a partir de un fluido corporal de una mujer embarazada con menos de 32 semanas (por ejemplo, de 26-28 semanas, o tan solo 12 semanas) de embarazo. El método también puede incluir la determinación de un cambio, tal como al menos un factor de cambio (por ejemplo, $\geq 1,5x$), en el transcriptoma de ARN de PLC de la madre embarazada. El cambio en el transcriptoma de ARN de PLC es predictivo de parto prematuro por parte de la madre embarazada. En un aspecto, la madre embarazada se puede seleccionar para que esté embarazada de menos de 32 semanas de gestación y que carece de rotura prematura de las membranas con parto prematuro.

En un aspecto, el ARN extraído de la madre embarazada se puede procesar mediante una matriz de expresión del transcrito completo. En otro aspecto, el método puede incluir la identificación de una o más secuencias de ARN que son predictivas de parto prematuro. Por ejemplo, la madre embarazada puede presentar una o más alteraciones de los niveles de las secuencias de ARN seleccionadas a partir de secuencias de biomarcadores de PTB en ARN de PLC que se asocian a la expresión, crecimiento celular, proliferación celular, ciclo celular, muerte celular, y ensamblaje y organización celular. El ARN de PLC puede ser cualquier tipo de ARN de PLC, tal como miARN o ARNm. El ARN puede estar asociado a la regulación celular, disfunción, contractilidad e inflamación de los músculos, y/o puede estar asociado a la quiescencia y/o activación del miometrio, y/o asociado a la expresión, crecimiento celular, proliferación celular, ciclo celular, muerte celular, y ensamblaje y organización celular.

En una realización, la presente invención puede incluir un método para predecir el parto prematuro antes de las 32 semanas de gestación. Dicho método puede incluir la obtención de datos relativos a los niveles de biomarcadores y de la edad de gestación y, opcionalmente, otros factores de la salud. Los datos se pueden introducir en una máquina, que puede procesar los datos mediante el análisis de los datos en un modelo matemático que tiene los parámetros de los niveles de marcadores y la edad de gestación y, opcionalmente, otros factores de la salud. Dicho análisis se puede utilizar para determinar el riesgo específico de parto prematuro de la paciente. En este método, el modelo matemático puede incluir parámetros relacionados con el cambio en una cantidad de ARN biomarcador de parto prematuro, ya sea porque aparezca, aumente o disminuya. El ARN biomarcador de parto prematuro puede ser cualquiera de los biomarcadores de ARN de PTB como se describe en el presente documento.

En una realización, la presente invención puede incluir un método para inhibir, prevenir, o tratar el PTB. Dicho método reflejaría la identificación del mecanismo causante de PTB en una mujer individual en base al perfil de los marcadores predictivos de PTB. El método puede incluir varios protocolos de selección de fármacos que pueden afectar o regular un biomarcador de PTB particular, en el que dicha regulación puede resultar en un inicio reducido de PTB. El método puede incluir la obtención de una sustancia que bloquea un mensaje de uno de los ARN de PTB descritos en este documento. Esto puede incluir el bloqueo de una señal biológica de PTB en un ARN pequeño, ARNm, ARN no codificante, y/o miARN. Una vez obtenida, la sustancia se puede administrar a una mujer embarazada antes de las 32 semanas de gestación con el fin de bloquear el efecto del marcador de PTB en el útero y su contenido. Por ejemplo, el ARN bloqueado puede ser uno o más de los biomarcadores de PTB en ARN de PLC descritos en este documento, en el que el bloqueo del ARN puede interrumpir uno o más genes iniciadores de nacimiento prematuro miometrial. Además, el biomarcador de PTB en ARN de PLC que se bloquea puede ser uno o más biomarcadores de miARN de PTB, en el que el bloqueo del miARN bloquea un gen iniciador de parto prematuro.

En una realización, el biomarcador de PTB en ARN de PLC aislado de la madre embarazada se puede normalizar frente a una secuencia de normalización. Si se trata de un biomarcador de PTB en ARNm de PLC, el ARN aislado se puede normalizar contra la secuencia de normalización de peptidilprolil isomerasa (SEQ ID NO: 1). Si se trata de un biomarcador de PTB en miARN de PLC, el ARN aislado se puede normalizar frente a una o más secuencias de normalización snARN:U6:96Aa (SEQ ID NO: 2), snARN:U6:96Ab (SEQ ID NO: 3), y/o snARN:U6:96Ac (SEQ ID NO: 4).

Los métodos descritos en este documento también pueden incluir cualquier método de aislamiento de ARN a partir de componentes sanguíneos. Esto puede incluir el aislamiento a partir de sangre completa o plasma sanguíneo.

En una realización, se puede proporcionar un kit de diagnóstico que incluye secuencias para identificar uno o más de estos biomarcadores de PTB en miARN de PLC y/o uno o más de estos biomarcadores de PTB en ARNm de PLC. Estas secuencias pueden ser las secuencias de la Lista de secuencias con las SEQ ID NOs: 5-300 y/o sus

cebadores y/o sondas. Los cebadores y sondas pueden ser al menos esencialmente únicos para estas secuencias de biomarcadores de PTB en ARN de PLC con hibridación adecuada a las mismas para los métodos y protocolos descritos en este documento. Los cebadores y/o sondas de los biomarcadores de PTB en ARN de PLC mencionados en la Lista de secuencias también se puede considerar que son biomarcadores de PTB en ARN de PLC para los fines de la invención puesto que estos cebadores y/o sondas están dirigidas a y se hibridan con secuencias específicas seleccionadas dentro de biomarcadores de PTB en ARN de PLC de la Lista de secuencias. Los biomarcadores de ARN se pueden configurar para que estén en formato de ácido nucleico, tal como ARN, ADN, o híbrido de ARN/ADN. El kit de diagnóstico puede incluir composiciones individuales que tienen cada una un único biomarcador de PTB en ARN de PLC, o una única composición puede incluir uno o más de estos biomarcadores de PTB en miARN de PLC y/o uno o más de estos biomarcadores de PTB en ARNm de PLC. Los biomarcadores de PTB en ARN de PLC se pueden proporcionar con o sin marcador, tal como un marcador visual o radiomarcador. El biomarcador de PTB en ARN de PLC se puede proporcionar en un chip o una tarjeta configurados para su uso en la detección y/o cuantificación y/o calificación de un ácido nucleico, chip o tarjeta que pueden estar configurados como una micromatriz. Uno o más puntos de muestra en una micromatriz pueden tener uno o más de estos biomarcadores de PTB en miARN de PLC y/o uno o más de estos biomarcadores de PTB en ARNm de PLC y/o sus cebadores y/o sondas. Por ejemplo, la micromatriz puede tener un punto con uno de los biomarcadores de PTB en miARN de PLC del cebador y/o la sonda y/o uno de los biomarcadores de PTB en ARNm de PLC del cebador y/o la sonda. Una micromatriz de este tipo puede tener uno o más puntos de biomarcadores de PTB en ARN de PLC, puntos que pueden ser pocillos de reacción o similares. Por ejemplo, la micromatriz se puede configurar como tarjeta de micromatrices de Affymetrix o cualquier avance en la tecnología razonablemente relacionado con la misma. La incorporación de estos biomarcadores de PTB en ARN de PLC en los diferentes productos de micromatrices permite que se utilicen con mayor facilidad para las muestras derivadas de plasma, y en mediciones repetidas de biomarcadores de PTB en ARN de PLC.

En una realización, un biomarcador de PTB en ARN de PLC puede ser un ácido nucleico que contiene o consiste en la secuencia que define el biomarcador de PTB en ARN de PLC diana o su complemento. El biomarcador de PTB en ARN de PLC puede ser idéntico a una de las SEQ ID NOs: 5-18 y/o 5-106 y/o 19-106 y/o 5-300 y/o 107-300 y/o 107-142 y/o 143-300, o puede ser un complemento de la misma, codificante o no codificante, así como una secuencia que se hibrida con la misma en condiciones adecuadas, así como sus cebadores y/o sondas. Para los fines de esta invención, los cebadores y/o sondas de las secuencias citadas se puede considerar que son biomarcadores de PTB en ARN de PLC ya que se utilizan para seleccionar como diana el ARN particular producido dentro de un sujeto. Los cebadores y sondas serán complementarios a las secuencias de SEQ ID NO: 5-300, ya que estas secuencias son las dianas. El biomarcador de PTB en ARN de PLC puede tener complementariedad perfecta o superior a o aproximadamente el 95 % de complementariedad, superior a o aproximadamente el 90 % de complementariedad, superior a o aproximadamente el 85 % de complementariedad, o superior a o aproximadamente el 80 % de complementariedad con las secuencias enumeradas o sus sondas y/o cebadores. El biomarcador de PTB en ARN de PLC puede ser continuo o puede tener una o más protuberancias o desemparejamientos tras la hibridación. El biomarcador de PTB en ARN de PLC también puede incluir una o más modificaciones químicas, tales como la modificación de un carbono 2'. El biomarcador de PTB en ARN de PLC puede o puede no formar un extremo saliente tras la hibridación. El biomarcador de PTB en ARN de PLC puede incluir una secuencia de aproximadamente 15 nucleótidos a la secuencia completa, de aproximadamente 16 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 18 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 22 nucleótidos en secuencia o complemento a una de las SEQ ID NOs: 5-18 y/o 5-106 y/o 19-106 y/o 5-300 y/o 107-300 y/o 107-142 y/o 143-300. El biomarcador de PTB en ARN de PLC puede incluir un segmento de secuencia única de la secuencia completa que tiene una longitud como se ha descrito.

En una realización, los métodos descritos en este documento se pueden realizar con micromatrices de exón y miARN, y sus niveles se pueden cuantificar utilizando PCR de alto rendimiento. El ARN se puede obtener a partir de una o más mujeres embarazadas al menos de 12 semanas de gestación hasta el parto. Los biomarcadores de ARN se pueden validar utilizando una tarjeta de PCR a medida de alto rendimiento que tiene los biomarcadores de PTB como se describe en el presente documento. Los biomarcadores de PTB de un grupo de mujeres se pueden validar frente a un segundo grupo de mujeres seleccionadas al azar con mujeres de PTB o de control que no tienen PTB o que tienen un nacimiento a término.

En una realización, los biomarcadores de ARNm/miARN de PLC de PTB se pueden manipular en presencia o con una cantidad a fin de modificar el flujo miometrial de Ca^{2+} que está mediado por los genes PTB miometriales. Ahora se ha comprobado que se pueden manipular los biomarcadores de PTB en ARN de PLC que se incrementaban o

disminuían significativamente en mujeres abocadas a PTB para modificar el flujo miometrial de Ca^{2+} que a su vez regula la contractilidad del miometrio. Por ejemplo, la expresión del ARNm de PLC de la apolipoproteína A-IV apoA-4 (ApoA4) de *Homo sapiens* ((SEQ ID NO: 66), ARNm, número de acceso NM_000482) aumentaba el flujo intracelular miometrial de Ca^{2+} . Otros biomarcadores de PTB en ARN de PLC se pueden usar de manera similar para manipular la función del miometrio.

PURIFICACIÓN DE ARN

Las técnicas de aislamiento de ARN existentes pueden producir ARN de PLC suficiente para una matriz, pero no para la validación por PCR necesaria de los cientos de genes identificados por la matriz a menos que el volumen de plasma sea alto. Esto explica la práctica común de utilizar tejidos sólidos (por ejemplo, placenta, miometrio, cuello del útero) para identificar candidatos y esperar cuantificarlos de forma individual en plasma utilizando Q-RT-PCR.

En consecuencia, la presente invención proporciona un método que, en un solo proceso, separa ARN intacto, incluyendo ARNm y miARN, ADN y proteínas. El proceso se basa en una separación de fase de fenol/isotiocianato de guanidinio/glicerol y da lugar a grandes cantidades de ácido nucleico de PLC de alta calidad con rendimientos de ARN total de 1,5-30 μg o más a partir de solo 2 ml de plasma. Esta cantidad es más que suficiente para la tecnología de matriz y la realización de numerosas reacciones de PCR usando una sola muestra clínicamente práctica de una paciente.

El método de aislamiento de ARN descrito en este documento permite el aislamiento de 1,5 microgramos a 7 microgramos de ARN de PLC a partir de una muestra de 2 ml, que es más que suficiente tanto para el uso de la matriz como para la validación por PCR. El método puede incluir la obtención de: 2 ml o más de muestra de un sujeto, tal como plasma; agua tratada con DEPC (Ambion); etanol (Sigma); cloroformo (Sigma); 3 M, pH: 5,5 acetato de sodio (Ambion); Phenol (Sigma); isotiocianato de guanidinio (Sigma); glicerol (Sigma); alícuota de 2 ml de muestra (por ejemplo, plasma) de una muestra de una paciente en 8 tubos, 250 μl de plasma en cada tubo. La purificación del ARN se lleva a cabo como sigue: plasma centrifugado a 200 x g durante 5 minutos a 4 °C; añadir 750 μl de tampón de lisis de fenol/isotiocianato de guanidina/glicerol por 2 ml de muestra, y pasar las muestras vigorosamente por el vortex durante 15 segundos e incubarlas durante 5 min; añadir 200 μl de cloroformo por muestra y pasar las muestras vigorosamente por el vortex e incubar a temperatura ambiente durante 10 min; centrifugar las muestras a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C, y obtener la fase acuosa superior para el aislamiento del ARN, y la fase inferior roja/fenol/cloroformo se pueden utilizar para el aislamiento del ADN y la proteína; transferir a un tubo nuevo 300 μl de la fase acuosa superior con cuidado de no perturbar la interfase, y añadir 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH: 5,5) (30 μl) más 3 volúmenes de etanol al 100 % enfriado en hielo en 900 μl a cada tubo (nota: 2 ml de plasma de una muestra de una paciente pueden dar lugar a 13-14 tubos); incubar los tubos durante la noche a -20 °C; centrifugar a 12.000 x g durante 75 minutos (por ejemplo, 4 °C), y eliminar todo el líquido; añadir 50 μl de etanol al 80 % enfriado en hielo a cada tubo, y lavar el sedimento, a continuación, transferir la totalidad de los tubos de muestra a un tubo, añadir 300-350 μl de etanol enfriado en hielo para llevar el etanol hasta una cantidad de aproximadamente 1 ml; centrifugar a 12.000 x g durante 60 minutos a 4 °C; eliminar todo el líquido, y ajustar a 37 °C para secar durante 40 minutos; volver a suspender el sedimento en aproximadamente 20-40 μl de agua DEPC, e incubar a 56 °C durante 10 minutos para disolver el ARN, y a continuación poner la muestra de ARN en hielo durante 30 minutos; y usar 2 μl de ARN, tomar la DO a 260 nm y 280 nm para determinar la concentración y la pureza de la muestra.

45 GENES DE MODULACIÓN DE PTB

En una realización, la presente invención puede modular el ARN de PLC a fin de regular el flujo intracelular de Ca^{2+} a través de su efecto sobre genes iniciadores prematuros del miometrio. Por ejemplo, se puede utilizar el ARN de PLC para regular la contractilidad del miometrio. Se determinó que había una interacción entre 4 biomarcadores de PTB en ARNm de PLC (por ejemplo, PSME2, NAMPT, APOA1 y APOA 4) y 6 genes iniciadores miometriales de PTB (por ejemplo, IFN-gamma, CD3e, HLA-DOA, NDRG4, VPS33A y ABCA7), y entre 1 miARN de PLC marcador de PTB (miRLET7 G) y 1 gen iniciador de PTB (Sorcs). Este hallazgo respalda la posibilidad de que los biomarcadores de PTB en ARNm de PLC y/o miARN se puedan utilizar para alterar la transcripción y/o traducción de genes iniciadores prematuros del miometrio. Se comprobó que 7 genes iniciadores de PTB, que se había identificado que están asociados a estos marcadores, podrían estar todos directa o indirectamente vinculados con el flujo de Ca^{2+} . Se construyó un vector pcDNA 3.1 con la longitud completa del ARNm de ApoA4 (Figura 5A). El éxito de la clonación del vector de genes se confirmó mediante digestión con las enzimas de restricción EcoR1 y Xho1 (Figura 5B). El vector se transfiere a células inmortalizadas humanas miometriales de embarazada PHM1 y la ApoA4 se expresa en exceso en las células PHM1 (Figura 5C). La expresión en exceso de la proteína ApoA4 incrementó drásticamente el

Ca²⁺ intracelular como se muestra en la Figura 5D. Puesto que la ApoA4 normalmente no se expresa en células miométriales en cultivo, se concibe que el efecto de la ApoA4 sobre el Ca²⁺ intracelular está mediado por genes iniciadores del miometrio locales. Por consiguiente, se concibe que el flujo de Ca²⁺ se puede modular con los otros biomarcadores de PTB en ARNm de PLC (por ejemplo, PSME2, NAMPT, APOA1), y el biomarcador de PTB en miARN de PLC (por ejemplo, miRLET7 G). Este enfoque se podría utilizar para identificar fármacos que se dirigen y modulan los biomarcadores de PTB en ARN de PLC descritos en este documento o aquellos que se desarrollen posteriormente. Por tanto, este enfoque se puede utilizar en métodos de tratamiento de una mujer en necesidad de inducción del parto, pero resistente a los métodos existentes. Además, se puede utilizar un enfoque similar en métodos de tratamiento de una mujer en necesidad de inhibir o prevenir el parto, pero resistente a los métodos existentes.

MÉTODOS

Plasma materno: Aislado en EDTA como se ha descrito anteriormente; formación de alícuotas y almacenado a -80 °C.

Aislamiento de ARN en plasma: El ARN en plasma se aísla mediante un método patentado desarrollado este último año. La muestra de plasma se lisa por tampón de fenol/isotiocianato de guanidinio/glicerol, y el ARN, el ADN y la proteína se aíslan en diferentes fases acuosas, después se precipitan usando una serie de soluciones químicas patentadas, los sedimentos se limpian y se resuspenden en 20-40 µl de agua DEPC, se incuban a 56 °C durante 10 minutos para disolver el ARN, y se almacenan a -80 °C. El rendimiento, la pureza y la integridad del ARN se identifican por Nanospectrometer y por el Bio-analizador Aligent.

Micromatriz de Affymetrix: Se analizan micromatrices del transcrito del genoma completo de Affymetrix y miARN. Se puede realizar la evaluación de la micromatriz QC. Cada protocolo es como indica el fabricante.

Validación de genes de miARN/ARNm de alto rendimiento: La ABI VIIA™ 7 se utiliza para la cuantificación de genes de ARNm/miARN de alto rendimiento utilizando un sistema de tarjeta a medida de matriz ABI. El sistema permite 384 reacciones de PCR en tiempo real en 2 horas usando una tarjeta de matriz de PCR (insertar imagen). En general, se utiliza el kit de transcripción inversa de microARN/ARN TagMan para generar el reservorio de ADNc. El reservorio de cebadores RT megaplex se genera en función de cada gen validado, y el ADNc sintetizado en las siguientes condiciones de ciclación térmica: 16 °C durante 2 minutos, 42 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 segundo durante 40 ciclos, a continuación, mantener a 85 °C durante 5 minutos. Se utiliza una reacción de preamplificación para ampliar las señales de los genes. Se preparan reservorios de cebadores de preamplificación para cada gen validado. Se utilizará la mezcla TaqMan PreAmp Master Mix. Las reacciones de preamplificación se realizan bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 minutos, 55 °C durante 2 minutos, 72 °C durante 2 minutos, a continuación 12 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 4 minutos, a continuación 99,9 °C para la etapa de desnaturalización final. El ADNc preamplificado se utiliza como molde. Los parámetros de validación se diseñan y se seleccionan en base a las secuencias de genes a medida.

Cultivo de células de miometrio: Se cultivan células de miometrio primarias y células de miometrio inmortalizadas de embarazada usando procedimientos convencionales. Todas las líneas celulares primarias se pueden obtener de una gran biopsia de miometrio del fondo uterino de una única paciente a término antes del parto.

Construcción de genes del plásmido recombinante pcDNA-PLC: La construcción del vector se utiliza para la expresión en exceso del gen marcador de PLC. Los genes diana se seleccionan de la matriz y los análisis IPA (Resultados preliminares). Los productos purificados de genes de PLC y el plásmido vector de expresión en eucariota (pcDNA 3.1) se digieren con EcoR1 y Xho1. La reacción de ligación se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen). Los genes pcDNA-PLC del plásmido final se transforman en *E. coli* JM 2163. Los productos de ligación se cultivan con medio LB que contiene ampicilina (100 µg/ml) durante la noche. Después, el plásmido recombinante se extrae de los transformantes de colonias antes de identificarlos mediante digestión con EcoR1 y Xho1, y se confirma por electroforesis en gel de agarosa. Se utiliza lipofectamina para la transfección. La expresión en exceso de los genes marcadores de PLC se demuestra por transferencia de Western y PCR en tiempo real. La técnica se estableció en nuestro laboratorio (Figura 6A).

Medida del flujo de Ca²⁺: Células miométriales se suspenden en 2 ml de medio DMEM que consiste en suero fetal bovino al 10 %, 30 µg de Fungizone, 1 % de penicilina-estreptomocina, 0,5 % de L-glutamina en DMEM (todos los ingredientes de Gibco Life Technologies), se calentó a 37 °C, y a continuación se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 25 mm. Las células se incubaron en fura 2-AM (2 x 10⁶ mol/l) durante 40 minutos a temperatura ambiente

en oscuridad. Los cubreobjetos se insertan en un microincubador abierto (PDMI-2, Medical Systems) y se conectan a la etapa de un microscopio invertido (Nikon EclipseTE2000, Nikon, Melville, NY). El microincubador se mantiene a 37 °C con un controlador de temperatura bipolar (TC-202, Medical Systems). Las imágenes se obtuvieron utilizando el *software* Nikon EZ-C1 y se procesaron con el *software* de imágenes Volocity (Improvision Inc., Lexington, MA).

- 5 Los datos se expresan como relación de fluorescencia emitida a 510 nm en células excitadas a 340 y 380 nm. Las respuestas a los genes o sus respectivos vehículos (DMSO, etanol) se analizan con siARN transfectado directamente o con el vector de expresión génico. Se registran los cambios en las relaciones de emisión a 340/380 nm. Se calcula la tasa de afluencia de Ca^{2+} en base a informes anteriores. Los datos se expresan como una relación de la fluorescencia emitida a 510 nm en células excitadas a 340 y 380 nm. Las respuestas a los genes o a sus
- 10 vehículos respectivos (DMSO, etanol) se analizan con el siARN transfectado directamente o con el vector de expresión génico. Se registran los cambios en las relaciones de emisión a 340/380 nm y se calcula la tasa de afluencia de Ca^{2+} .

- El experto en la materia apreciará que, para este y otros procesos y métodos descritos en este documento, las
- 15 funciones realizadas en los procesos y métodos se pueden implementar en un orden diferente. Además, las etapas y operaciones resumidas solamente se proporcionan como ejemplos, y algunas de las etapas y operaciones pueden ser opcionales, se pueden combinar en menos etapas y operaciones, o se pueden ampliar en etapas y operaciones adicionales sin apartarse de la esencia de las realizaciones descritas.

- 20 La presente divulgación no está limitada en términos de las realizaciones particulares descritas en esta solicitud, que están previstas como ilustraciones de varios aspectos. Se pueden introducir muchas modificaciones y variaciones sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en la materia. Los métodos y aparatos funcionalmente equivalentes dentro del alcance de la descripción, además de los enumerados en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de las descripciones anteriores. Se pretende
- 25 que dichas modificaciones y variaciones entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación ha de estar limitada solamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes a los que dichas reivindicaciones tienen derecho. Debe entenderse que esta divulgación no se limita a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que naturalmente pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento se usa a fin de describir
- 30 solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante.

- En lo que respecta a la utilización de esencialmente cualquier término en plural y/o en singular en este documento, los expertos en la materia pueden trasladar del plural al singular y/o del singular al plural si es adecuado al contexto y/o la aplicación. Para mayor claridad, en este documento se pueden establecer expresamente diversas
- 35 permutaciones singular/plural.

- Los expertos en la materia deben entender que, en general, los términos utilizados en el presente documento, y especialmente en las reivindicaciones adjuntas (por ejemplo, cuerpo de las reivindicaciones adjuntas) en general se consideran términos "abiertos" (por ejemplo, el término "que incluye" se debe interpretar como "que incluye, pero no
- 40 limitado a," el término "que tiene" se debe interpretar como "que tiene al menos", el término "comprende" se debe interpretar como "comprende pero no se limita a", etc.). Los expertos en la materia además deben entender que si se pretende un número específico en una mención de una reivindicación introducida, esa intención se menciona de manera explícita en la reivindicación, y en ausencia de dicha mención dicha intención no está presente. Por ejemplo, como ayuda para su comprensión, las siguientes reivindicaciones adjuntas pueden contener el uso de las frases
- 45 introductorias "al menos uno" y "uno o más" para introducir menciones de reivindicación. Sin embargo, el uso de dichas frases no debe interpretarse que implique que la introducción de una mención de reivindicación por los artículos indeterminados "un" o "una" limite toda reivindicación particular que contenga dicha mención de reivindicación introducida a realizaciones que contienen solamente dicha mención, incluso cuando la misma reivindicación incluye las frases introductorias "uno o más" o "al menos uno" y artículos indeterminados tales como
- 50 "un" o "una" (por ejemplo, "un" y/o "una" se deben interpretar en el sentido de "al menos uno" o "uno o más"); lo mismo es cierto para el uso de los artículos determinados utilizados para introducir menciones de reivindicación. Además, incluso si explícitamente se menciona un número específico de una mención de reivindicación introducida, los expertos en la materia reconocerán que dicha mención se debe interpretar en el sentido de al menos el número
- 55 mencionado (por ejemplo, la mención escueta de "dos menciones", sin otros modificadores, significa al menos dos menciones, o dos o más menciones). Además, en los casos en que se utiliza una convención análoga a "al menos uno de A, B, y C, etc.", en general una construcción de este tipo está prevista en el sentido en que el experto en la materia entiende la convención (por ejemplo, "un sistema que tiene al menos uno de A, B, y C" incluiría, pero no se limita a los sistemas que tienen solo A, solo B, solo C, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B, y C juntos, etc.). En los casos en que se utiliza una convención análoga a "al menos uno de A, B, o C, etc.", en general una

construcción de este tipo está prevista en el sentido en que el experto en la materia entiende la convención (por ejemplo, "un sistema que tiene al menos uno de A, B, o C" incluiría, pero no se limita a los sistemas que tienen solo A, solo B, solo C, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B, y C juntos, etc.). Además, los expertos en la materia entienden que prácticamente cualquier palabra y/o frase disyuntiva que presente dos o más términos
 5 alternativos, ya sea en la descripción, en las reivindicaciones o en los dibujos, debe entenderse que contempla la posibilidad de incluir uno de los términos, cualquiera de los términos o ambos términos. Por ejemplo, la frase "A o B" se entiende que incluye las posibilidades de "A" o "B" o "A y B".

Además, cuando se describen características o aspectos de la divulgación en términos de grupos de Markush, los
 10 expertos en la materia reconocerán que la divulgación también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

Como comprenderá el experto en la materia, para todos y cada uno de los fines, tales como en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos descritos en este documento también abarcan todos y
 15 cada uno de los subintervalos y sus combinaciones de subintervalos posibles. Cualquier intervalo listado se puede reconocer fácilmente como suficientemente descriptivo y que permite que el mismo intervalo se descomponga en al menos mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos iguales, etc. Como ejemplo no limitante, cada intervalo descrito en el presente documento, se puede descomponer fácilmente en un tercio inferior, un tercio medio, y un tercio superior, etc. Como también comprenderá un experto en la materia toda construcción tal como "hasta", "al menos", y similares
 20 incluyen el número mencionado y se refieren a los intervalos que se puedan descomponer posteriormente en subintervalos como se ha descrito anteriormente. Finalmente, como entenderá por un experto en la materia, un intervalo incluye cada miembro individual. Así, por ejemplo, un grupo que tiene de 1-3 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, o 3 células. Del mismo modo, un grupo que tiene 1-5 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4, o 5 células, y así sucesivamente.

25 Un segmento único de una secuencia en un listado de secuencias es un segmento de secuencia específica que se encuentra dentro de la secuencia indicada de la SEQ ID NO, y esencialmente ausente en el resto del transcriptoma de ARN. Es decir, el segmento único de la secuencia en la Lista de secuencias identificado por la SEQ ID NO se puede utilizar como sonda o cebador que es específico para esa SEQ ID NO. Para identificar uno o más segmentos
 30 únicos de cada SEQ ID NO mencionada en la Lista de secuencias se pueden usar las técnicas disponibles para la identificación de un cebador o una sonda disponibles para el experto en la materia.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia de biomarcador de nacimiento prematuro (PTB) en ARN de plasma libre de células (PLC) que incluye o es complementaria a una o más de las SEQ ID NOs: 5-300 o a una sonda o cebador específicos para ellas, el ácido nucleico que está presente en una cantidad suficiente para su uso en un protocolo de diagnóstico de ácido nucleico en el diagnóstico de susceptibilidad a PTB.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición además comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia de normalización que incluye o es complementaria a una o más de las SEQ ID NOs: 1-4 y 301-303 o a una sonda o cebador específicos para ellas, el ácido nucleico que está presente en una cantidad suficiente para su uso en un protocolo de normalización de ácido nucleico.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la composición tiene dos o más de las secuencias de normalización.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición comprende uno o más de:
 - un ácido nucleico que tiene una secuencia biomarcadora de PTB en ARN de PLC que incluye o es complementaria a una o más de las SEQ ID NOs: 5-18 o a una sonda o cebador específicos para ellas;
 - un ácido nucleico que tiene una secuencia biomarcadora de PTB en ARN de PLC que incluye o es complementaria a una o más de las SEQ ID NOs: 19-106 o a una sonda o cebador específicos para ellas;
 - un ácido nucleico que tiene una secuencia biomarcadora de PTB en ARN de PLC que incluye o es complementaria a una o más de las SEQ ID NOs: 107-142 o a una sonda o cebador específicos para ellas; o
 - un ácido nucleico que tiene una secuencia biomarcadora de PTB en ARN de PLC que incluye o es complementaria a una o más de las SEQ ID NOs: 143-300 o a una sonda o cebador específicos para ellas.
5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la composición tiene dos o más de las secuencias de biomarcadores de PTB en ARN de PLC.
6. Un método para predecir la susceptibilidad de una mujer embarazada a parto prematuro (PTB), que comprende:
 - obtener ácidos nucleicos del transcriptoma de ARN de plasma libre de células (PLC) de una muestra de plasma libre de células de la mujer embarazada; y
 - determinar un cambio en el transcriptoma de ARN de PLC en la muestra obtenida de la mujer embarazada, en el que el cambio es indicativo de la susceptibilidad a PTB,
 - en el que el transcriptoma de ARN de PLC incluye un biomarcador de PTB en ARN de PLC que tiene una o más secuencias de una o más de las SEQ ID NOs: 5-300 o su complemento; y en el que el cambio en el transcriptoma de ARN de PLC comprende al menos uno de:
 - regulación por aumento de un biomarcador de PTB en ARN de PLC que tiene una o más secuencias de una o más de las SEQ ID NOs: 5-7, 19-41 y 107-142 o su complemento; o
 - regulación por disminución de un biomarcador de PTB en ARN de PLC que tiene una o más secuencias de una o más de las SEQ ID NOs: 8-18, 42-106 y 143-300 o su complemento.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la muestra incluye ARN de PLC de aproximadamente 16 semanas a aproximadamente 32 semanas de gestación.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que el transcriptoma de ARN de PLC incluye un biomarcador de PTB en ARN de PLC que tiene una o más secuencias de una o más de las SEQ ID NOs: 19-106 o su complemento.

9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el transcriptoma de ARN de PLC incluye un biomarcador de PTB en miARN de PLC que está regulado por aumento a fin de indicar la susceptibilidad de PTB, el biomarcador de PTB en miARN de PLC que tiene una secuencia de una o más de las SEQ ID NOs: 5-7 o su complemento.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el transcriptoma de ARN de PLC incluye un biomarcador de PTB en miARN de PLC que está regulado por disminución a fin de indicar la susceptibilidad de PTB, el biomarcador de PTB en miARN de PLC que tiene una secuencia de una o más de las SEQ ID NOs: 8-18 o su complemento.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el transcriptoma de ARN de PLC incluye un biomarcador de PTB de ARN pequeño de PLC que está regulado por aumento a fin de indicar la susceptibilidad de PTB, el biomarcador de PTB de ARN pequeño de PLC que tiene una secuencia de una o más de las SEQ ID NOs: 19-41 y/o 107-142 o su complemento.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que el transcriptoma de ARN de PLC incluye un biomarcador de PTB de ARN pequeño de PLC que está regulado por disminución a fin de indicar la susceptibilidad de PTB, el biomarcador de PTB de ARN pequeño de PLC que tiene una secuencia de una o más de las SEQ ID NOs: 42-106 y/o 143-300 o su complemento.
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, que comprende uno o más de:
- uso de un cebador y/o una sonda que es complementario a y se hibrida con una de las SEQ ID NOs: 5-106 con el fin de identificar el cambio en un transcriptoma de ARN de PLC;
- uso de un cebador y/o una sonda que incluye la secuencia de una de las SEQ ID NOs: 107-300 con el fin de identificar el cambio en un transcriptoma de ARN de PLC;
- uso de un cebador y/o una sonda que incluye la secuencia de una de las SEQ ID NOs: 107-142 con el fin de identificar una regulación por aumento de un biomarcador de PTB en ARN de PLC; o
- uso de un cebador y/o una sonda que incluye la secuencia de una de las SEQ ID NOs: 142-300 con el fin de identificar una regulación por disminución de un biomarcador de PTB en ARN de PLC.
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, que comprende:
- comparar la cantidad de uno o más biomarcadores de PTB en ARN de PLC a partir de una primera muestra y una segunda muestra obtenidas de la mujer embarazada, en el que un cambio en la cantidad indica susceptibilidad a PTB, en el que la primera muestra incluye uno o más biomarcadores de PTB en ARN de PLC del transcriptoma de ARN de PLC antes de las 12 semanas de gestación y la segunda muestra incluye uno o más biomarcadores de PTB en ARN de PLC después de las 12 semanas de gestación; y
- determinar al menos un factor de cambio en la cantidad de uno o más biomarcadores de PTB en ARN de PLC del transcriptoma de ARN de PLC entre la primera muestra y la segunda muestra.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, que comprende la normalización de la cantidad de biomarcador de PTB en ARN de PLC a partir del transcriptoma de ARN de PLC mediante el uso de una o más de las secuencias de normalización que incluyen o son complementarias a una o más de las SEQ ID NOs: 1-4 y 301-303 o uno de sus segmentos únicos.

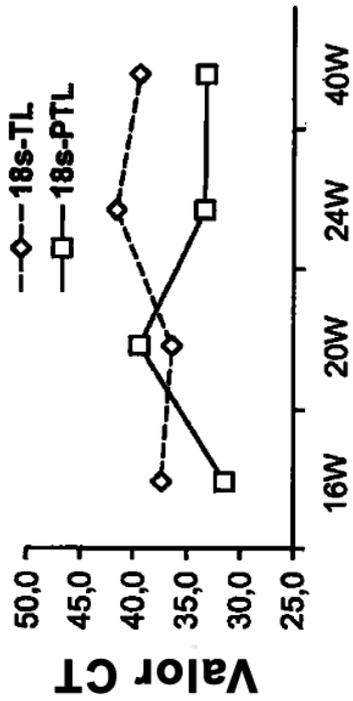


Fig. 1A

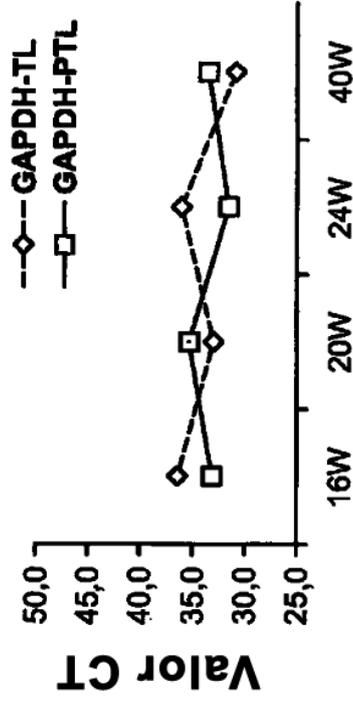


Fig. 1B

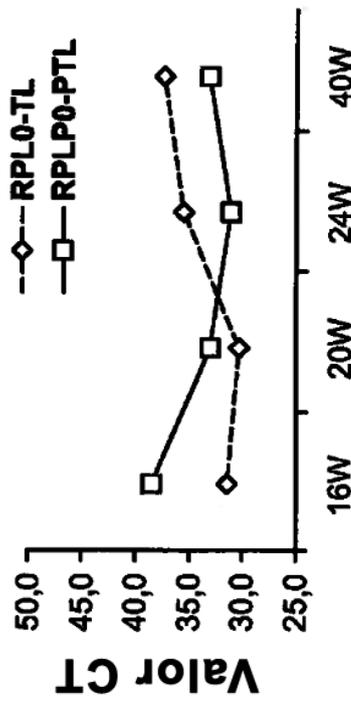


Fig. 1C

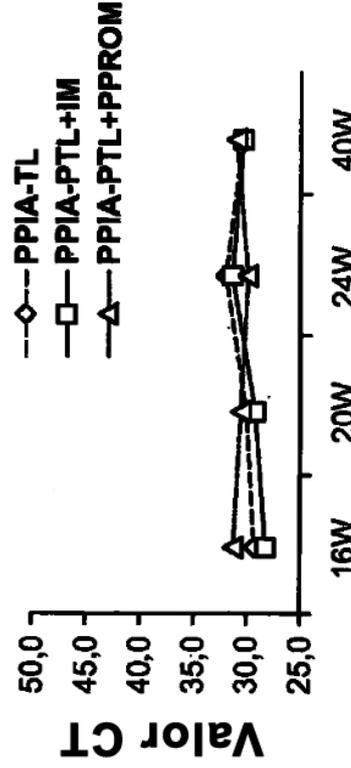


Fig. 1D

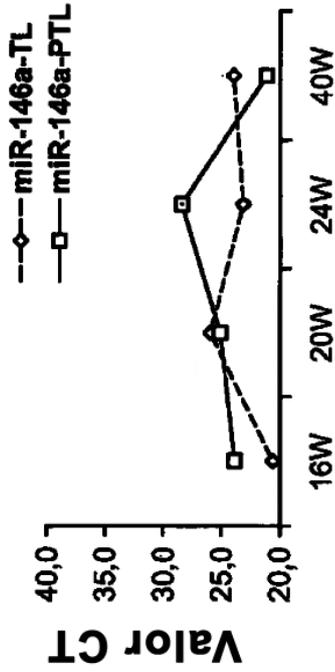


Fig. 2B

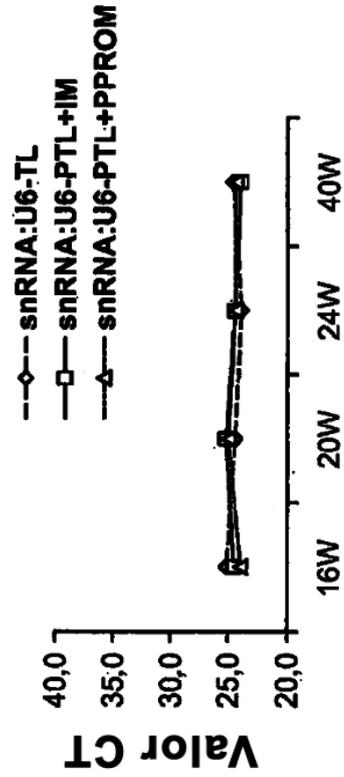


Fig. 2D

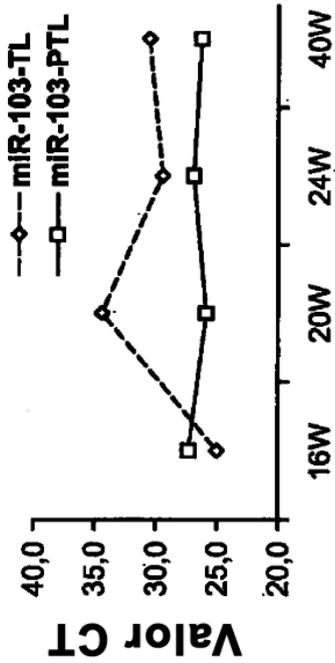


Fig. 2A

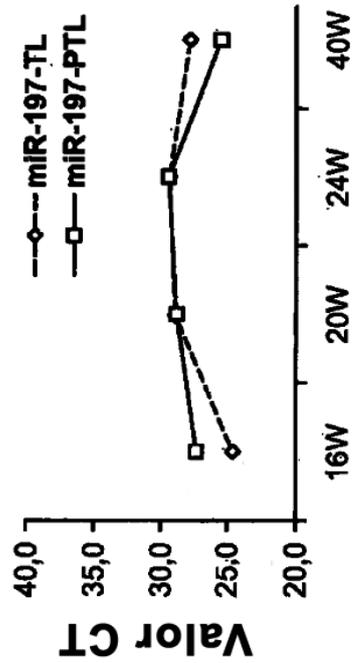


Fig. 2C

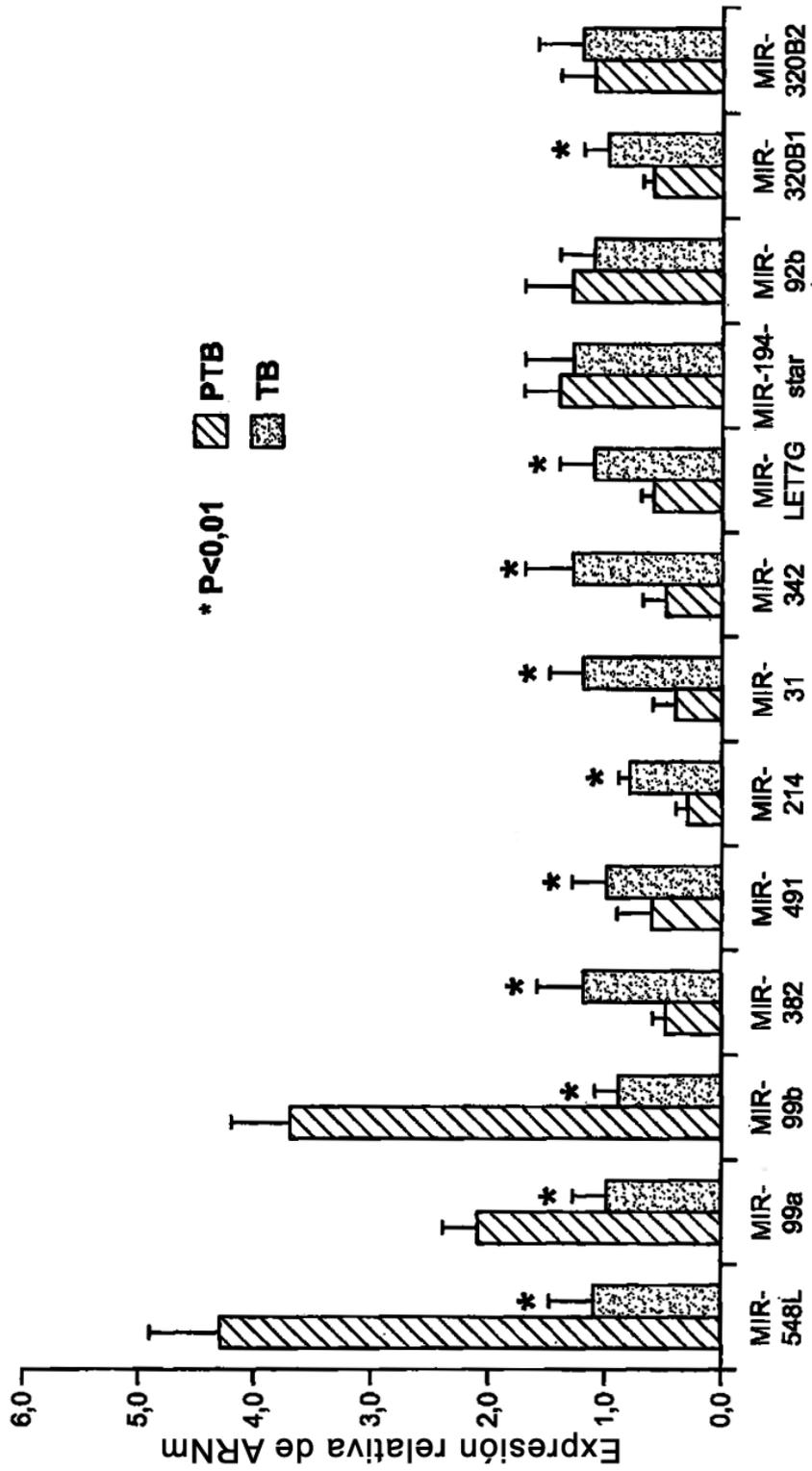


Fig. 3

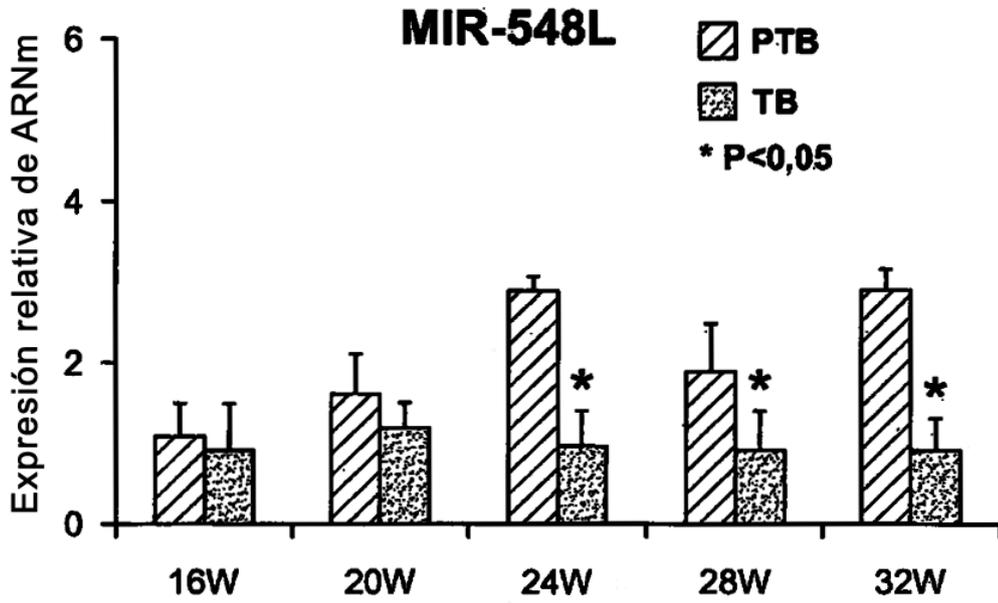


Fig. 4A

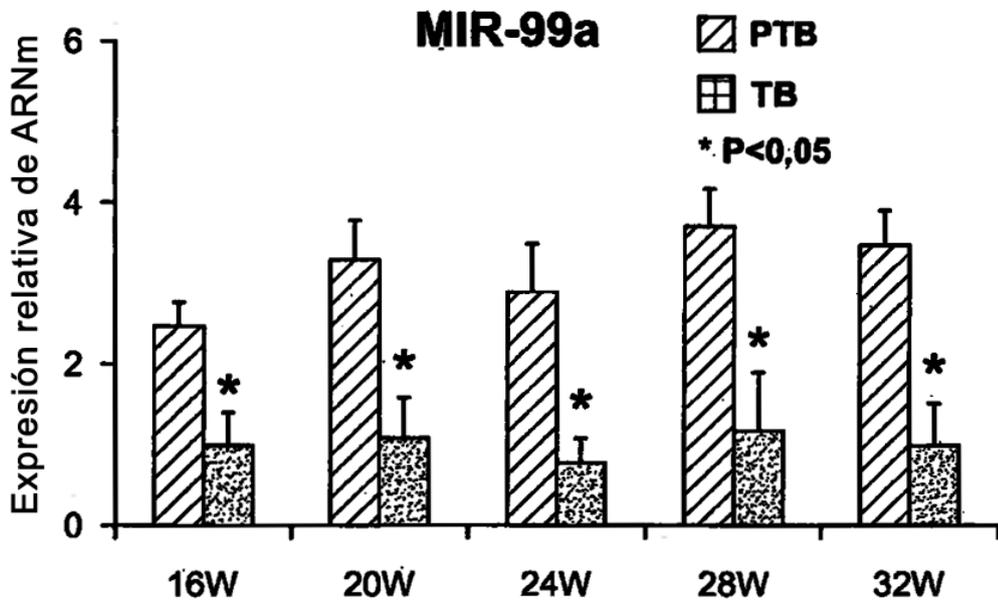


Fig. 4B

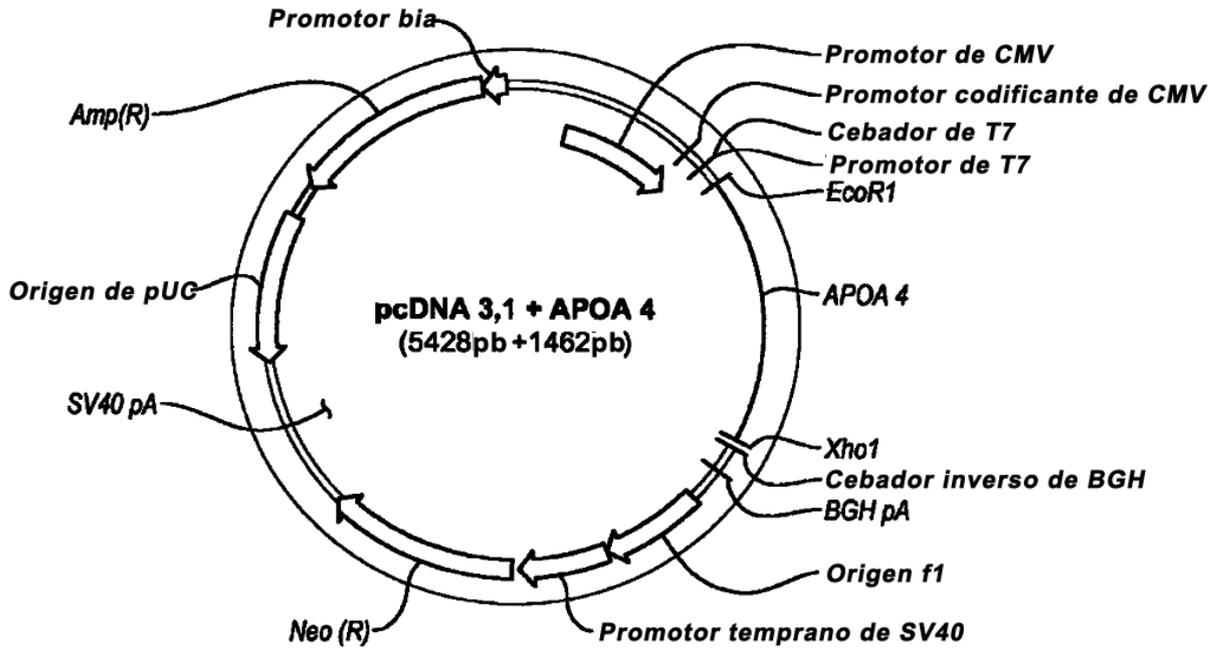


Fig. 5A

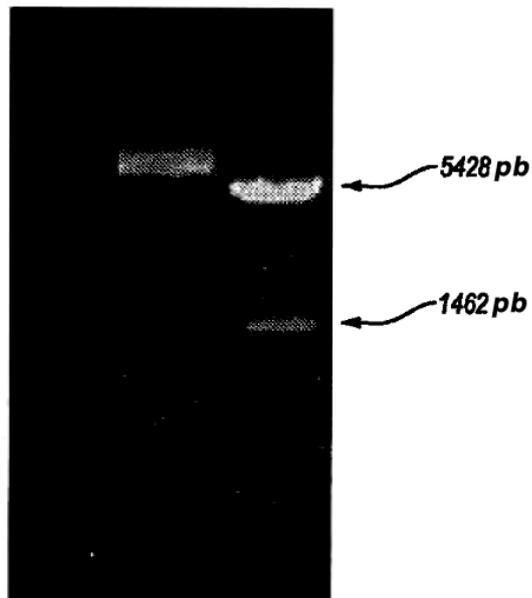


Fig. 5B

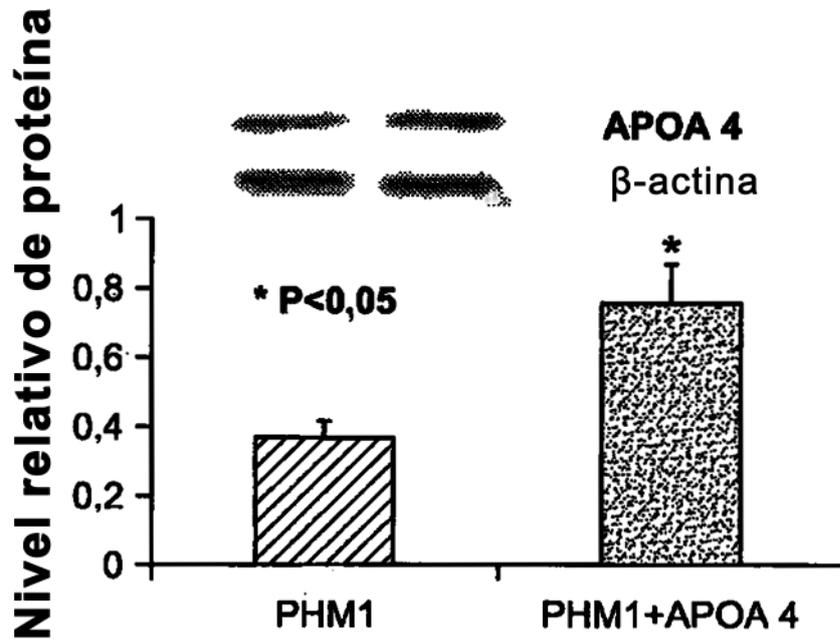


Fig. 5C

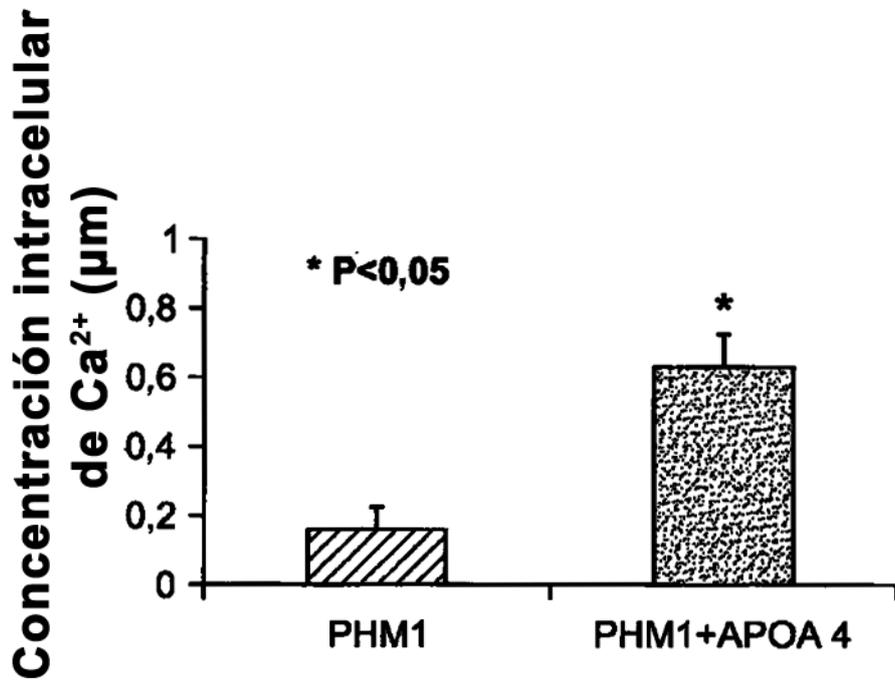


Fig. 5D