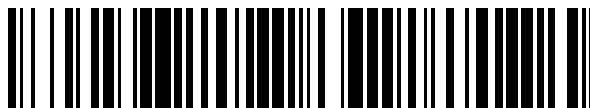


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 638**

21 Número de solicitud: 201630725

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**01.06.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.01.2018**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2017/070387**

71 Solicitantes:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (65.0%)  
Avda. de la Constitución, 18  
41071 Sevilla ES y  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (35.0%)**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ PEDRERA, Rosario;  
AGUIRRE ZAMBRANO, María Ángeles;  
COLLANTES ESTÉVEZ, Eduardo;  
BARBARROJA PUERTO, Nuria;  
PÉREZ SÁNCHEZ, Carlos y  
JIMÉNEZ GÓMEZ, Yolanda**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **MicroARNs circulantes como biomarcadores del Síndrome Antifosfolípido Primario**

57 Resumen:

MicroARNs circulantes como biomarcadores clínicos del síndrome antifosfolípido primario.

Uso de los microARNs: miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y miR-15a para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento en un individuo o sujeto que sufra potencialmente síndrome antifosfolípido primario, método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del síndrome antifosfolípido primario en un individuo o sujeto que sufra potencialmente síndrome antifosfolípido, kit o dispositivo, microarray y usos.

**ES 2 648 638 A1**

**DESCRIPCIÓN**

**MicroARNs circulantes como biomarcadores del Síndrome Antifosfolípido Primario**

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Biología Molecular y la Medicina Clínica, y específicamente se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de pacientes con síndrome antifosfolípido primario (APS, del inglés *primary antiphospholipid syndrome*), así como para la tipificación de la patología aterotrombótica que sufren dichos pacientes.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

El Síndrome Antifosfolípido es un desorden autoinmune, clasificado por ORPHANET como enfermedad rara (ORPHA80). Se caracteriza por el desarrollo de trombosis arteriales y/o venosas de repetición y/o una historia obstétrica con prematuridad y preeclampsia, en presencia de títulos elevados de anticuerpos antifosfolípido, principalmente anticuerpos anti cardiolipina de isotipo IgG o IgM, anti-B2glicoproteína I y anticoagulante Lúpico.

Diferentes estudios publicados por nuestro grupo de investigación han mostrado que el estatus protrombótico de los pacientes APS es el resultado de diversos mecanismos subyacentes, incluyendo la activación monocítica inducida por los anticuerpos antifosfolípido, los cuales generan disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, y promueven la expresión alterada de un número de moléculas relacionadas con inflamación y trombosis, como el factor tisular y el factor de crecimiento endotelial vascular entre otros.

Recientemente, la tecnología genómica ha permitido explicar los mecanismos fisiopatológicos que controlan la enfermedad vascular en pacientes APS, cómo estas alteraciones pueden estar asociadas a estos desordenes autoinmunes, y su respuesta a diferentes aproximaciones terapéuticas. Un importante y emergente mecanismo que controla la expresión génica es la Epigenética. La Epigenética o regulación de la expresión génica mediante alteraciones independientes de la secuencia de ADN, está aportando nuevos enlaces entre la genómica y los factores ambientales. Comprende la metilación del ADN, modificación de histonas y la actividad de los microARNs, los cuales actúan sobre los niveles de expresión génica y proteica. Los microARNs (miARNs o miR) son pequeños ácidos ribonucleicos ácidos (ARN) que juegan un papel crítico en la regulación génica a nivel post-transcripcional. Los microARNs afectan de manera crucial al Sistema inmune y parecen tener un papel relevante en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes y cardiovasculares. Un número de estudios han analizado el perfil de expresión de microARNs en células de sangre periférica, fluidos biológicos y tejidos de pacientes con Lupus. Estos

trabajos han mostrado la existencia de una firma de miARNs asociadas con la actividad de la enfermedad. En el Síndrome Antifosfolípido (APS), existe hasta la fecha solo un artículo, publicado por nuestro grupo de investigación, que ha identificado dos microARNs como moduladores potenciales de la expresión del factor tisular (TF), el principal inductor de trombosis en pacientes APS. Diferentes estudios han mostrado que los microARNs son atractivos biomarcadores potenciales por diferentes razones:

- Su perfil de expresión refleja procesos patológicos subyacentes.
- Los microARNs pueden ser detectados en una variedad de fuentes, incluyendo tejidos, células sanguíneas y fluidos biológicos.
- En comparación con ARNs mensajeros (mARNs), son estables y resistentes a la degradación, debido a su pequeño tamaño y protección en complejos miARN-proteína o en microvesículas (i.e. exosomas) en sangre y fluidos biológicos.

Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio ha evaluado el perfil de miARNs plasmáticos y su relación con la fisiopatología de la enfermedad. Así pues, el principal objetivo de este estudio, fue determinar el perfil de miARNs plasmáticos en APS, e identificar potenciales miARNs que puedan representar biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y la tipificación de la patología aterotrombótica de pacientes APS.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso simultáneo de los biomarcadores de microARNs: miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y miR-15a, o cualquiera de sus combinaciones, para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del síndrome antifosfolípido primario (APS).

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra del APS que comprende:

a) cuantificar el producto de expresión de los biomarcadores miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y/o miR-15a en una muestra biológica aislada de dicho individuo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el primer método de la invención además comprende:

b) calcular el índice A según la ecuación:

$$A = \frac{1}{1 + e^{-\beta_0 - \sum_{i=1}^5 \beta_i X_i}}$$

5

donde:  $\beta_0 = -7,01449$ ,  $\beta_1 = 1,13676$ ,  $\beta_2 = 0,16051$ ,  $\beta_3 = 0,19897$ ,  $\beta_4 = 0,20980$ ,  $\beta_5 = 0,13676$ ,  $x_1 = -\log_2(\text{miR20a/miR145})$ ,  $x_2 = -\log_2(\text{miR145/miR296})$ ,  $x_3 = -\log_2(\text{miR374/miR34a})$ ,  $x_4 = -\log_2(\text{miR374/miR124})$  y  $x_5 = \text{edad del paciente}$ ,

10 c) calcular los índices  $B_1$ ,  $B_2$  y/o  $B_3$  según las ecuaciones:

$$B_1 = -\log_2(\text{miR19b/miR15a}); B_2 = -\log_2(\text{miR20a/miR374}); B_3 = -\log_2(\text{miR374/miR34a})$$

d) calcular los índices  $C_1$  y/o  $C_2$  según las ecuaciones:

$$C_1 = -\log_2(\text{miR19b/miR124}); C_2 = -\log_2(\text{miR19a/miR296})$$

15 asignando en cada ecuación los valores de los biomarcadores correspondientes obtenidos en el paso (a).

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (b) según el primer método de la invención, y además comprende:

20 e) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS cuando el valor del índice A del paso (b) sea preferiblemente mayor que 0,4, más preferiblemente mayor que 0,5, y aún más preferiblemente mayor que 0,6.

25 Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

f) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea preferiblemente mayor que 4,9, más preferiblemente mayor que 5,2, y aún más preferiblemente mayor que 5,542.

5 Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante cuarto método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

10 g) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis venosa cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea preferiblemente menor que 5,742, más preferiblemente menor que 5,642, y aún más preferiblemente menor o igual que 5,542 y cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) sea preferiblemente menor que -0,165, más preferiblemente menor que -0,265, y aún más preferiblemente menor o igual que -0,356.

15 Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante quinto método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

20 h) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea preferiblemente menor que 5,742, más preferiblemente menor que 5,642, y aún más preferiblemente menor o igual que 5,542 y cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) se encuentra preferiblemente en el rango entre (-0,556, 0,736), más preferiblemente en el rango entre (-0,456, 0,636), y aún más preferiblemente entre (-0,356, 0,536].

25 Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante sexto método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

30 i) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea preferiblemente menor que 5,742, más preferiblemente menor que 5,642, y aún más preferiblemente menor o igual que 5,542, cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) sea preferiblemente mayor que 0,336, más preferiblemente mayor que 0,436, y aún más preferiblemente mayor que 0,536, y cuando el valor del índice  $B_1$  del paso (c) sea preferiblemente menor que 5,152, más preferiblemente menor que 5,052, y aún más preferiblemente menor o igual que 4,952.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante séptimo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

- 5           j) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea preferiblemente menor que 5,742, más preferiblemente menor que 5,642, y aún más preferiblemente menor o igual que 5,542, cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) sea preferiblemente mayor que 0,336, más preferiblemente mayor que 0,436, y aún más preferiblemente mayor que 0,536, y cuando el  
10           valor del índice  $B_1$  del paso (c) sea preferiblemente mayor que 4,752, más preferiblemente mayor que 4,852, y aún más preferiblemente mayor que 4,952.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante octavo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (d) según el primer método de la invención, y además  
15           comprende:

- k) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con aterosclerosis o ecodoppler patológico cuando el valor del índice  $C_1$  del paso (d) sea preferiblemente menor que 13,198, más preferiblemente menor que 12,198, y aún más preferiblemente menor o igual que 11,198 y cuando el valor del índice  $C_2$  del paso (d) sea  
20           preferiblemente mayor que 5,690, más preferiblemente mayor que 6,690, y aún más preferiblemente sea mayor que 7,690.

En una realización preferida de cualquiera de los aspectos de la invención, la muestra biológica aislada del paso (a) es una muestra de plasma, suero u orina. Preferiblemente la muestra biológica aislada del paso (a) es una muestra de plasma.

- 25           Un **décimo aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para detectar los niveles de expresión de los microARNs: miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y miR-15a, tal y como se han definido en el primer aspecto de la invención.

- 30           En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión los microARN: miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y miR-15a, y donde:

5 - los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.

15 - las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 80 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.

20 - los anticuerpos son capaces de unirse a una región formada por cualquiera de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.

25 Un **décimo primer aspecto** de la invención, se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.

30 Un **décimo segundo aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención o del microarray de la invención, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra APS.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1. A.** miARNs diferencialmente expresados en el plasma de pacientes APS vs Controles Diagrama de barras de los miARNs diferencialmente expresados en plasma de pacientes APS en relación a donantes sanos, identificados mediante un PCR-array. **B.** 5 *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). Clasificación funcional de los microARNs utilizando el software.

**Figura 2. A y B.** Modelo de combinación de los ratios de microARNs que discrimina APS de donantes sanos y curva ROC.

**Figura 3. A y B.** Modelo de combinación de los ratios de microARNs que discrimina 10 pacientes APS con trombosis arterias y venosa y curva ROC.

**Figura 4. A y B.** Modelo de combinación de los ratios de microARNs que discrimina pacientes APS con ecodoppler patológico y normal y curva ROC.

**Figura 5.** Tablas de correlación entre ratios de microARNs y parámetros relacionados con autoinmunidad, inflamación y enfermedad cardiovascular.

15 **Figura 6. A y B.** Diagramas de barras mostrando asociaciones estadísticas entre ratios de microARNs y ocurrencia de perdidas fetales y positividad para anticuerpos antifosfolípido.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han analizado los niveles de microARNs en muestras de plasma de pacientes con síndrome antifosfolípido primario en comparación con otros 20 pacientes sanos. Los resultados indican que los microARNs presentes en el plasma pueden ser usados como marcadores de un sistema diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del síndrome antifosfolípido primario.

### BIOMARCADORES DE LA INVENCION

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de los biomarcadores de 25 microARNs: miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, miR-15a, o cualquiera de sus combinaciones, para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del síndrome antifosfolípido primario (APS), de ahora en adelante biomarcadores de la invención. En una realización preferida, el uso de los microARNs es simultáneo.



Los biomarcadores de la invención pueden usarse simultáneamente, por separado o en cualquier combinación de los mismos para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, se utilizan conjuntos de ratios entre los biomarcadores de la invención para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS. Preferiblemente, los conjuntos de ratios formados entre biomarcadores de la invención para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS usados son:

- miR-20a/miR-145, miR-145/miR-296, miR-374/miR34a y miR374/124,
- miR-19b/miR-15a, miR-20a/miR-374 y miR-374/miR-34a,
- 10 • miR-19b/miR-124 y miR-15a/miR-296.

El término “microARN” se refiere a ARN monocatenario de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, no codificantes para proteínas y generados de transcritos endógenos que pueden formar estructuras en forma de horquilla (Lee *et al.*, 2004. *Embo. Journal*, 23 (20), 4051-4060). Los microARNs conforman una gran familia de genes reguladores postranscripcionales que controlan muchos procesos celulares y del desarrollo en eucariotas, cumpliendo una gran cantidad de funciones. Se estima que el 30% de todos los genes humanos son regulados por mecanismos dependientes de microARNs (Rajewsky N. 2006. *Nature Genetics*, 38, Suppl: S8-13) y que un solo microARN puede regular alrededor de 200 diferentes transcritos que pueden funcionar en diferentes vías en la célula (Krek *et al.*, 2005, *Nature Genetics*, 37 (5), 495-500), así como que un mismo ARNm puede ser regulado por múltiples microARNs (Cai *et al.*, 2009. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 7 (4), 147-154).

25 El término “Síndrome Antifosfolípido Primario” es un desorden autoinmune caracterizado por la asociación de una historia obstétrica, con pérdidas fetales o prematuridad y pre-eclampsia, y trombosis vasculares de tipo arterial y/o venoso. La trombosis es la complicación más severa del síndrome. Se trata de la trombofilia adquirida más frecuente, responsable del 20% de los accidentes cerebrovasculares y del 18% de los infartos de miocardio en menores de 50 años.

30 Los marcadores serológicos de este síndrome son los anticuerpos antifosfolípido, principalmente anticuerpos anticardiolipina (ACAs) o anticoagulante lúpico. Los ACAs se unen sobre la superficie celular principalmente a través de una proteína de unión fosfolipídica, la  $\beta$ 2GPI y la protrombina.

Se han propuesto numerosos mecanismos para explicar los procesos protrombóticos/proinflamatorios asociados al APS, aunque la patogénesis parece ser multifactorial. Un proceso esencial es la activación monocítica inducida por los anticuerpos antifosfolípido (ACA), la cual promueve un aumento de la actividad procoagulante, mediante la activación del principal receptor activador de la coagulación sanguínea, el Factor Tisular, cuya expresión se halla incrementada en los monocitos de estos pacientes (Cuadrado MJ, *et al.*, 1997. *Arthritis Rheum.*, 40:834-41). La señalización intracelular asociada a dicha activación está mediada por los receptores activados por proteasas (PARs, -mediadores de respuestas críticas para la trombosis, hemostasia y procesos inflamatorios y participantes en el desarrollo de arteriosclerosis), cuya expresión se encuentra también incrementada en los monocitos de los pacientes con SAF (López-Pedrerera et al., *Arthritis Rheum.* 2010; 62:869-77). En estudios recientes, se ha descrito que dicha señalización intracelular, inducida por los ACAs, implica la activación constitutiva de MAPK y NFkB (López-Pedrerera et al. 2006. *Arthritis Rheum.* 54:301-11), así como la promoción de la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y su receptor Flt1 (Cuadrado MJ, et al. 2006. *J. Thromb. Haemost.* 4:2461-69). La sobreexpresión de dichos mediadores protromboticos y proinflamatorios conducen a un estado pro-trombotico y al desarrollo de aterosclerosis acelerada en estos pacientes.

El control de los factores de riesgo de trombosis es pues crucial en los pacientes APS. El tratamiento tradicional de la trombosis se ha basado principalmente en la administración continuada de anticoagulantes. No obstante, el riesgo de sangrado es elevado y la ocurrencia de recurrencias es aun frecuente. Así pues, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el manejo de la afectación aterotrombótica en estos pacientes.

#### MÉTODOS DE LA INVENCIÓN

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra del APS, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo,

a') cuantificar el producto de expresión del miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y/o miR-15a,

o alternativamente,

a) cuantificar el producto de expresión de los biomarcadores miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y/o miR-15a en una muestra biológica aislada de dicho individuo.

5 Aunque preferiblemente se cuantifica el producto de expresión de los 8 microARNs simultáneamente, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra APS, la detección de cualquiera de ellos y, preferiblemente de las ratios: miR-20a/miR-145, miR-145/miR-296, miR-374/miR34a, miR374/124, miR-19b/miR-15a, miR-20a/miR-374, miR-374/miR-34a, miR-19b/miR-124 y miR-15a/miR-296, resulta informativo.

10 El término “producto de expresión”, también denominado “producto génico” se refiere al material bioquímico, ya sea ARN (por ejemplo microARN) o proteína, resultante de la expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen.

15 La cuantificación del producto de expresión de los microARNs, o la detección de la expresión de sus correspondientes genes, puede realizarse por cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica. Preferiblemente, la cuantificación se realiza mediante PCR a tiempo real (Q-RT-PCR).

20 La medida de los niveles de expresión de un gen, preferiblemente de manera cuantitativa, está basada en una señal que se obtiene directamente de los transcritos de dichos genes (ARNm, microARN, etc.), y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de ARN producidas por los genes. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. Por otro lado, se podría realizar mediante medida indirecta que se refiere a la medida obtenida de un componente  
25 secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

30 La técnica preferiblemente utilizada es la llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Según esta técnica, utilizando oligonucleótidos, enzimas, cebadores y solución tampón, se amplifica de forma exponencial un fragmento de ADN original. Esta técnica es llevada a cabo en un aparato llamado termociclador que mantiene la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo. La detección en tiempo real se basa en la utilización de marcadores fluorescentes (sondas) que se unen a todas las secuencias de doble cadena de ADN formadas en los ciclos de la reacción de PCR. Una vez

que el marcador se une al ácido nucleico de doble cadena, éste emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real (Walter *et al.*, 2002, *Science*, 296, 557-559). El ciclo al cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente supera un umbral determinado es llamado Ct. Los niveles de expresión de un microARN son calculados como  $2^{-Ct}$ .

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el primer método de la invención además comprende:

b) calcular el índice A según la ecuación:

$$A = \frac{1}{1 + e^{-\beta_0 - \sum_{i=1}^5 \beta_i X_i}}$$

donde:  $\beta_0 = -7,01449$ ,  $\beta_1 = 1,13676$ ,  $\beta_2 = 0,16051$ ,  $\beta_3 = 0,19897$ ,  $\beta_4 = 0,20980$ ,  $\beta_5 = 0,13676$ ,  $x_1 = -\log_2(\text{miR20a/miR145})$ ,  $x_2 = -\log_2(\text{miR145/miR296})$ ,  $x_3 = -\log_2(\text{miR374/miR34a})$ ,  $x_4 = -\log_2(\text{miR374/miR124})$  y  $x_5 = \text{edad del paciente}$ ,

c) calcular los índices  $B_1$ ,  $B_2$  y/o  $B_3$  según las ecuaciones:

$$B_1 = -\log_2(\text{miR19b/miR15a}); B_2 = -\log_2(\text{miR20a/miR374}); B_3 = -\log_2(\text{miR374/miR34a})$$

d) calcular los índices  $C_1$  y/o  $C_2$  según las ecuaciones:

$$C_1 = -\log_2(\text{miR19b/miR124}); C_2 = -\log_2(\text{miR19a/miR296})$$

asignando en cada ecuación los valores de los biomarcadores correspondientes obtenidos en el paso (a).

De esta manera, para el cálculo de los índices de la invención A-C hay que considerar que el valor de los cocientes entre los biomarcadores de microARNs (miRX/miRY) se obtiene mediante el  $\log_2(2^{-CtX}/2^{-CtY})$ , donde miRX o X se refiere al microARN indicado en el numerador y miRY o Y indicado microARN en el denominador.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (b) según el primer método de la invención, y además comprende:

- 5 e) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS cuando el valor del índice A del paso (b) sea preferiblemente mayor que 0,4, más preferiblemente mayor que 0,5, y aún más preferiblemente mayor que 0,6.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante tercer método de la invención, que  
10 comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

f) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea preferiblemente mayor que 4,9, más preferiblemente mayor que 5,2, y aún más preferiblemente mayor que 5,542.

15 Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante cuarto método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

20 g) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis venosa cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea preferiblemente menor que 5,742, más preferiblemente menor que 5,642, y aún más preferiblemente menor o igual que 5,542 y cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) sea preferiblemente menor que -0,165, más preferiblemente menor que -0,265, y aún más preferiblemente menor o igual que -0,356.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante quinto método de la invención, que  
25 comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

30 h) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea preferiblemente menor que 5,742, más preferiblemente menor que 5,642, y aún más preferiblemente menor o igual que 5,542 y cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) se encuentra preferiblemente en el rango entre (-0,556, 0,736), más preferiblemente en el rango entre (-0,456, 0,636), y aún más

preferiblemente entre  $(-0,356, 0,536]$ , indicando el corchete que el valor 0,536 está incluido en el intervalo.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante sexto método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

i) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea preferiblemente menor que 5,742, más preferiblemente menor que 5,642, y aún más preferiblemente menor o igual que 5,542, cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) sea preferiblemente mayor que 0,336, más preferiblemente mayor que 0,436, y aún más preferiblemente mayor que 0,536, y cuando el valor del índice  $B_1$  del paso (c) sea preferiblemente menor que 5,152, más preferiblemente menor que 5,052, y aún más preferiblemente menor o igual que 4,952.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante séptimo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

j) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea preferiblemente menor que 5,742, más preferiblemente menor que 5,642, y aún más preferiblemente menor o igual que 5,542, cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) sea preferiblemente mayor que 0,336, más preferiblemente mayor que 0,436, y aún más preferiblemente mayor que 0,536, y cuando el valor del índice  $B_1$  del paso (c) sea preferiblemente mayor que 4,752, más preferiblemente mayor que 4,852, y aún más preferiblemente mayor que 4,952.

El término "APS con trombosis arterial" se refiere a pacientes que han presentado episodios de trombosis en alguna zona del árbol arterial (TA). La TA más común en el APS ocurre en el cerebro, manifestándose como accidente cerebro-vascular establecido o un ataque isquémico transitorio. Estos eventos isquémicos pueden ser recurrentes y múltiples, progresando el paciente hacia un estado de demencia vascular. Otros tipos de eventos trombóticos arteriales se presentan en el mesenterio, y su expresión clínica es la de una angina o de necrosis intestinal; en las extremidades, manifestándose como una gangrena, o coronario, con angina o infarto de miocardio. Se han descrito adicionalmente algunos casos de hipertensión severa asociada con trombosis arterial renal y glomerular.

El término “APS con trombosis venosa” se refiere a pacientes que han presentado episodios de trombosis en alguna zona del árbol venoso (TV). La trombosis venosa profunda es la manifestación trombotica de tipo venoso más frecuentemente asociada con el APS; es a menudo recurrente y puede llevar a tromboembolismo pulmonar en la tercera parte de los  
5 pacientes. Otras formas menos comunes son las trombosis de las venas renales, el síndrome de Budd-Chiari, el compromiso de las venas porta o mesentérica o de las glándulas suprarrenales, que puede derivar en hemorragias e insuficiencia. También se ha informado la trombosis de la vena central de la retina.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, clasificación  
10 y/o seguimiento del APS, de ahora en adelante octavo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (d) según el primer método de la invención, y además comprende:

k) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con aterosclerosis o ecodoppler patológico cuando el valor del índice  $C_1$  del paso (d) sea  
15 preferiblemente menor que 13,198, más preferiblemente menor que 12,198, y aún más preferiblemente menor o igual que 11,198 y cuando el valor del índice  $C_2$  del paso (d) sea preferiblemente mayor que 5,690, más preferiblemente mayor que 6,690, y aún más preferiblemente sea mayor que 7,690.

En pacientes APS también se detecta la presencia de “aterosclerosis” o “ecodoppler  
20 patológico” (síndrome caracterizado por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en la capa íntima de las paredes de las arterias de mediano y grueso calibre que deriva en el cierre del vaso y el desarrollo de trombosis), facilitada por la presencia de autoanticuerpos de tipo anti-cardiolipina de isotipo IgG en estos pacientes.

En una realización preferida de cualquiera de los aspectos de la invención, la muestra  
25 biológica aislada del paso (a) es una muestra de plasma, suero u orina. Preferiblemente la muestra biológica aislada del paso (a) es una muestra de plasma.

Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos  
30 biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada del paso (a) es una muestra de plasma.

Los métodos de la invención pueden desarrollarse independientemente o conjuntamente, en cualquier combinación de los mismos.

Los pasos (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j) y/o (k) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la cuantificación del paso (a) o el cálculo computarizado de cualquiera de los índices de los pasos (b), (c) y/o (d), o la clasificación computarizada en los pasos (e), (f), (g), (h), (i), (j) y/o (k).

KIT O DISPOSITIVO DE LA INVENCION, MICROARRAY DE LA INVENCION Y USOS

Un **décimo aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para detectar los niveles de expresión de los microARNs: miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y miR-15a, tal y como se han definido en el primer aspecto de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión los microARN: miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y miR-15a, y donde:

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 80 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9,



SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.

5 - los anticuerpos son capaces de unirse a una región formada por cualquiera de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los anticuerpos están modificados. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo es humano, humanizado o sintético. En otra realización preferida, el anticuerpo es monoclonal y/o se encuentra marcado con un fluorocromo. Preferiblemente, el fluorocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, alofocianina, o cualquiera de sus combinaciones.

**Tabla 1.** microARNs de la invención.

Nombre del gen	Gen ID	Nombre del miARN	Secuencia del gen	Secuencia del miARN
microARN-124a ( <i>MIR124A</i> )	406907	hsa-miR-124-3p	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 9
microARN-145 ( <i>MIR145</i> )	406937	hsa-miR145-5p	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 10
microARN-20a ( <i>MIR20A</i> )	406982	hsa-miR20a-5p	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 11
microARN-296 ( <i>MIR296</i> )	407022	hsa-miR296-5p	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 12

microRNA-34a ( <i>MIR34a</i> )	447040	hsa-miR34a-5p	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 13
microRNA-374a ( <i>MIR374A</i> )	442919	hsa-miR374a-5p	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 14
microRNA-19b ( <i>MIR19b</i> )	406980	hsa-miR19b-3p	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 15
microRNA-15A ( <i>MIR15A</i> )	406948	hsa-miR15a-5p	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 16

En el contexto de la presente invención, los genes *MIR124A*, *MIR145*, *MIR20A*, *MIR296*, *MIR34a*, *MIR374A*, *MIR19b* y *MIR15A* se definen también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de los microARNs recogidas respectivamente en las SEQ ID recogidas en la tabla 1, y que comprendería a diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un microARN que comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID recogidas en la tabla 1,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un microARN que comprende la secuencia nucleotídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con las SEQ ID recogidas en la tabla 1, respectivamente, y en las que el microARN codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de los

microARNs *MIR124A*, *MIR145*, *MIR20A*, *MIR296*, *MIR34a*, *MIR374A*, *MIR19b* y *MIR15A*. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra las recogidas en las SEQ ID indicadas en la tabla1.

Secuencias de la invención:

5 SEQ ID NO: 1:

AGGCCTCTCTCTCCGTGTTACAGCGGACCTTGATTTAAATGTCCATACAATTAAGGCAC  
GCGGTGAATGCCAAGAATGGGGCTG

SEQ ID NO: 2:

10 CACCTTGTCTCACGGTCCAGTTTTCCAGGAATCCCTTAGATGCTAAGATGGGGATTC  
CTGGAAATACTGTTCTTGAGGTCATGGTT

SEQ ID NO: 3:

GTAGCACTAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAGTGTTTAGTTATCTACTGCATTATGAGCACT  
TAAAGTACTGC

SEQ ID NO: 4:

15 AGGACCCTTCCAGAGGGCCCCCCTCAATCCTGTTGTGCCTAATTCAGAGGGTTGGGT  
GGAGGCTCTCCTGAAGGGCTCT

SEQ ID NO: 5:

GGCCAGCTGTGAGTGTTTCTTTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTGTGAGCAATAGTAAG  
G AAGCAATCAGCAAGTATACTGCCCTAGAAAGTGCTGCACGTTGTGGGGCCC

20 SEQ ID NO: 6:

TACATCGGCCATTATAATAACAACCTGATAAGTGTTATAGCACTTATCAGATTGTATTGTAA  
TTGTCTGTGTA

SEQ ID NO: 7:

25 CACTGTTCTATGGTTAGTTTTGCAGGTTTG CATCCAGCTGTGTGATATTCTGCTGTGCAA  
ATCCATGCAAACTGACTGTGGTAGTG

SEQ ID NO: 8:

CCTTGGAGTAAAGTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGATTTTGAAAAGGTGCAGGCCATA  
T TGTGCTGCCTCAAAAATACAAGG

SEQ ID NO: 9:

UAAGGCACGCGGUGAAUGCC

5 SEQ ID NO: 10:

GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU

SEQ ID NO: 11:

UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG

SEQ ID NO: 12:

10 AGGGCCCCCCCUCAAUCCUGU

SEQ ID NO: 13:

UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU

SEQ ID NO: 14:

UUAUAAUACAACCUGAUAAGUG

15 SEQ ID NO: 15:

UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA

SEQ ID NO: 16:

UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG

20 El kit además puede contener, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

Por otro lado, el kit o dispositivo de la invención puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la  
25 invención.

El kit de la invención puede incluir controles positivos y/o negativos. El kit además puede

contener, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención es un kit de partes, que comprende un componente A, formado por un dispositivo para la recogida de la muestra del paso a), y un componente B, formado por los elementos necesarios para llevar a cabo el análisis cuantitativo en la muestra del paso a) o cualquiera de los métodos de la invención.

En una realización preferida el kit o dispositivo de la invención comprende oligonucleótidos. En otra realización preferida, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo radiactivo, normalmente  $^{32}\text{P}$  o tritio, nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

Un **décimo primer aspecto** de la invención, se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser construidas en la superficie un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

Así, las sondas de oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos.

La síntesis *in situ* sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse a, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda

es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: miARN, ARN mensajero, ARN total, un fragmento de PCR, etc.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray de la invención presenta oligonucleótidos modificados, como se han descrito en el anterior aspecto de la invención.

Un **décimo segundo aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención o del microarray de la invención, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra APS.

10 La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención.

15 Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Un **décimo tercer aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

20 En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito  
25 integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un  
30 disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

Un **décimo cuarto aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Un **décimo quinto aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Una "secuencia de ácido nucleico o polinucleótido" puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N<sup>6</sup>-metil-adenina, N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N<sup>6</sup>-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de

aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

En la presente invención se entiende por variante o fragmento biológicamente activo, aquellas variantes o fragmentos de los péptidos indicados que tienen un efecto fisiológico, metabólico o inmunológico igual, o presentan la misma utilidad que los descritos. Esto es, son funcionalmente equivalentes. Dichos efectos se pueden determinar mediante métodos convencionales.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 287 (1984) *Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)*; BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410).

El término "individuo" o "sujeto", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a un animal, preferiblemente a un mamífero, y más preferiblemente a un ser humano. El término "individuo" en esta memoria, es sinónimo de "paciente", y no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física. El individuo puede ser cualquiera, un individuo predispuesto a una enfermedad (por ejemplo, cáncer de pulmón) o un individuo que padece dicha enfermedad.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### **EJEMPLO DE LA INVENCION**

El principal objetivo de este estudio fue determinar el perfil de miARNs circulantes en pacientes APS e identificar aquellos miARNs circulantes que pueden representar biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y la tipificación del *status* aterotrombótico de la enfermedad, es decir, APS con trombosis arterial o APS con trombosis venosa y/o APS con aterosclerosis o ecodoppler patológico.



**Tabla 1.** Parámetros clínicos y de laboratorio de los sujetos incluidos en el estudio.

	<b>Pacientes APS n=90</b>	<b>Controles n=42</b>	<b>p</b>
<b>Parámetros Clínicos</b>			
Mujeres/Hombres	48/42	22/20	
Edad (años)	51,2 ± 13,1	46,2 ± 13,4	n.s.
Trombosis arterial (n)	35/90	0	
Trombosis venosa (n)	55/90	0	
Recurrencias (n)	37/90	0	
Abortos (n)	23/90	0	
Obesidad (n)	38/90	2/42	
CIMT patológica (n)	24/90	6/42	
Índice Tobillo-Brazo (ABI) (Izquierdo)	1,3 ± 0,11	1,2 ± 0,09	0,02
Índice Tobillo-Brazo (ABI) (Derecho)	1,27 ± 0,11	1,2 ± 0,09	0,02
Anticoagulante Lúpico positivo (n)	85/90	0	
aCL IgG, GLP	23,4 ± 72	1,3 ± 1,1	0,00
aCL IgM, MLP	21,8 ± 52	4,9 ± 5,2	0,00
Anti-B2GPI, SGU	5 ± 7,7	1 ± 0,7	0,02
Antiagregantes, ASA/clopidogel (n)	30/90	0	
Anticoagulantes, warfarin/acenocoumarol (n)	62/90	0	
<b>Parámetros de laboratorio</b>			
Colesterol total, mg/dL	191,7 ± 32,06	190 ± 41,8	n.s.
Colesterol HDL, mg/dL	51,09 ± 12,4	55,4 ± 13,1	n.s.
Colesterol LDL, mg/dL	112,1 ± 33,2	118,1 ± 26,9	n.s.
Triglicéridos, mg/dL	155,1±163,2	88,3 ± 50,07	n.s.
VSG, mm/h	13,5 ± 13,6	10,2 ± 8,7	n.s.

El estudio se llevó a cabo en 90 pacientes APS y 42 donantes sanos, cuyas características clínicas se muestran en la tabla 1. Se obtuvieron muestras de plasma de pacientes y donantes sanos, en las que se determinaron varios parámetros relacionados con autoinmunidad, inflamación y enfermedad cardiovascular, incluyendo los niveles de la velocidad de sedimentación globular (VSG), el grosor de la íntima media carotídea (CIMT) y el índice tobillo-brazo (ABI).

El análisis del perfil de miARNs en el plasma de pacientes APS se realizó mediante el “*Human Serum & Plasma miRNA PCR array*” de Qiagen. Para ello, se realizó un pool con 2 µl del ARN purificado del plasma de 10 pacientes APS, y otro pool con 2 µl de ARN purificado del plasma de 10 donantes sanos. La purificación del ARN se realizó mediante el kit “*miRNeasy Serum/plasma*” de Qiagen a partir de 200 µl de plasma a los que se le añadió 5 fmoles del cel-miR-39 como “*spike in control*” en el momento de la extracción. Los niveles de expresión fueron analizados mediante un software específico de Qiagen y los datos se normalizaron respecto a la expresión del cel-miR-39. Posteriormente se realizaron estudios de validación de miARNs seleccionados en todos los individuos incluidos en el estudio mediante RT-PCR y sondas Taqman específicas.

El análisis del PCR array en el plasma de pacientes APS mostró un incremento en los niveles de expresión de 19 miARNs, mientras que 20 se encontraron disminuidos (Figura 1A).

El análisis funcional, realizado utilizando el software Ingenuity Pathway, de los miRNAs alterados en el array reveló que un alto número de ellos tenían mRNA dianas involucrados en procesos patológicos tales como enfermedad del sistema reproductor, desórdenes del tejido conectivo y respuesta inflamatoria (Figura 1B).

Con el objetivo de identificar posibles biomarcadores específicos de enfermedad en APS, seleccionamos aquellos miARNs más diferencialmente expresados en el array y más directamente relacionados con los procesos fisiopatológicos del APS (miR 19b, miR-20a, miR-124, miR-206, miR-145a, miR-34a, miR-15a, miR-374a, miR-133b, miR-296, and miR-210). Los resultados obtenidos tras analizar los niveles de expresión de los miARNs seleccionados mediante RT-PCR en la cohorte de 90 pacientes y 42 donantes sanos, mostró que diferentes ratios recíprocas de un perfil específico de miRNAs podía discriminar pacientes APS de donantes sanos (Figura 2).

El uso de ratios recíprocos es una aproximación que permite solventar el problema de la normalización de los datos de miARNs circulantes obtenidos mediante RT-PCR. Además, estos ratios presentan la ventaja de que en ciertos casos, miARNs cuya concentración está alterada en la patología en direcciones opuestas, pueden ser más efectivos en la clasificación de las poblaciones de estudio.

Así, se desarrolló un modelo que permite diferenciar pacientes APS de donantes sanos en base a los niveles de expresión de estos miARNs, seleccionando el grupo de miARNs (miARN-124, miARN-145, miARN-20a, miARN-296, miARN-34a and miARN-374) con el

mayor poder predictivo y combinándolos con la edad biológica del paciente. Este modelo fue evaluado mediante el análisis estadístico “10-fold cross validation”, obteniendo un área bajo la curva ROC del 80% y una sensibilidad y especificidad del 80% y el 72%, respectivamente. (Figura 2).

- 5 También nos interesamos en la identificación miARNs circulantes que pudiesen servir como biomarcadores no invasivos útiles en la tipificación de aspectos clínicos relevantes para la patología aterotrombótica presente en estos pacientes.

10 Encontramos que un grupo de 5 miARNs (15a, 19b, 20a, 34a, 374), permitían discriminar el tipo de trombosis sufrida por un paciente APS. De esta forma, desarrollamos un modelo que integraba ratios recíprocos de estos miARNs para poder discriminar la trombosis arterial de la venosa con una sensibilidad del 90%, especificidad del 80% y un área bajo la curva ROC de 82%, evaluado mediante el análisis estadístico “10-fold cross validation” (Figura 3).

15 Además, identificamos 4 miARNs (15a, 19b, 124, 296) cuyos ratios se asociaban con un incremento patológico del grosor de la íntima media carotídea. Construimos un modelo con estos miARNs que podía identificar un proceso de aterosclerosis temprana con un 69% de sensibilidad y 89% de especificidad, siendo el área bajo la curva ROC igual a 0.79 (Figura 4).

Para evaluar la relevancia de la expresión alterada de estos ratios de miARNs en el plasma de pacientes APS, realizamos diferentes estudios de correlación y asociación.

20 Los estudios de correlación mostraron que diferentes ratios de los miARNs del plasma que integraban la firma en APS, correlacionaban significativamente con parámetros relacionados con autoinmunidad tales como los títulos de anticuerpos antifosfolípido. Además, los niveles de expresión de estos miARNs correlacionaron con marcadores inflamatorios como la velocidad de sedimentación globular (VSG), así como con parámetros relacionados con enfermedad cardiovascular como el índice tobillo-brazo (Figura 5).

Los estudios de asociación reflejaban que la relación entre diferentes miARNs de la firma en APS se asociaba con pérdidas fetales en estos pacientes. Además tres de estos microARNs estaban también asociados con la positividad para anticuerpos antifosfolípido (Figura 6).

30 Para hallar la relevancia clínica de estos resultados, investigamos el impacto potencial de esta firma de miARNs en el plasma de los pacientes APS sobre sus miARN dianas relacionadas con procesos patológicos claves de esta condición autoinmune.

El análisis de las potenciales dianas, mediante el software Ingenuity Pathway, identificó un número de genes como dianas de al menos dos de los once miARNs que integran la firma. Este análisis generó una red de interacción que incluye los miARNs alterados en el plasma de los pacientes APS (en el centro) y sus dianas específicas, involucradas en procesos patológicos como la enfermedad arterial coronaria, trombosis, abortos y disfunción cerebrovascular (Figura 7).

Entre estos mARN dianas, se reconocieron genes protrombóticos y proinflamatorios bien conocidos como participantes en dichos procesos patológicos, tales como el factor tisular (F3), trombina (F2), VEGFA, FLT-1, MCP-1 (CCL2) o PPAR, entre otros.

En suma, nuestros datos sugieren que:

Diversos miARNs, diferencialmente expresados en el plasma de pacientes APS, se asocian con perfiles clínicos específicos de esta patología autoinmune. Hemos desarrollado diferentes modelos que identifican una firma de miARNs definidos que pueden servir como biomarcadores para el diagnóstico y la tipificación del estatus aterotrombótico en APS.

Por lo tanto, los niveles circulantes de microARNs específicos pueden ser considerados herramientas útiles en la prevención y manejo de la enfermedad en pacientes APS.

20

**REIVINDICACIONES**

1.- Uso simultáneo de los biomarcadores de microARNs: miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y miR-15a para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del síndrome antifosfolípido primario (APS).

2.- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra del APS, que comprende:

a) cuantificar el producto de expresión de los biomarcadores miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y/o miR-15a en una muestra biológica aislada de dicho individuo.

3.- El método según la reivindicación anterior, que además comprende:

b) calcular el índice A según la ecuación:

$$A = \frac{1}{1 + e^{-\beta_0 - \sum_{i=1}^5 \beta_i X_i}}$$

donde:  $\beta_0 = -7,01449$ ,  $\beta_1 = 1,13676$ ,  $\beta_2 = 0,16051$ ,  $\beta_3 = 0,19897$ ,  $\beta_4 = 0,20980$ ,  $\beta_5 = 0,13676$ ,  $x_1 = -\log_2(\text{miR20a/miR145})$ ,  $x_2 = -\log_2(\text{miR145/miR296})$ ,  $x_3 = -\log_2(\text{miR374/miR34a})$ ,  $x_4 = -\log_2(\text{miR374/miR124})$  y  $x_5 = \text{edad del paciente}$ ,

c) calcular los índices  $B_1$ ,  $B_2$  y/o  $B_3$  según las ecuaciones:

$$B_1 = -\log_2(\text{miR19b/miR15a}); B_2 = -\log_2(\text{miR20a/miR374}); B_3 = -\log_2(\text{miR374/miR34a})$$

d) calcular los índices  $C_1$  y/o  $C_2$  según las ecuaciones:

$$C_1 = -\log_2(\text{miR19b/miR124}); C_2 = -\log_2(\text{miR15a/miR296})$$

asignando en cada ecuación los valores de los biomarcadores correspondientes obtenidos en el paso (a).

4.- Un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS que comprende los pasos (a) y (b) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

e) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS cuando el valor del índice A del paso (b) sea mayor que 0,6.

5.- Un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS que comprende los pasos (a) y (c) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

f) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea mayor que 5,542.

5 6.- Un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS que comprende los pasos (a) y (c) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

g) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis venosa cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea menor o igual que 5,542 y cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) sea menor o igual que -0,356.

10 7.- Un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS que comprende los pasos (a) y (c) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

h) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea menor o igual que 5,542 y cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) se encuentra preferiblemente en el rango entre (-0,356, 0,536).

15 8.- Un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS que comprende los pasos (a) y (c) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

i) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis arterial cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea menor o igual que 5,542, cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) sea mayor que 0,536, y cuando el valor del índice  $B_1$  del paso (c) sea menor o igual que 4,952.

20 9.- Un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS que comprende los pasos (a) y (c) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

j) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con trombosis venosa cuando el valor del índice  $B_2$  del paso (c) sea menor o igual que 5,542, cuando el valor del índice  $B_3$  del paso (c) sea mayor que 0,536, y cuando el valor del índice  $B_1$  del paso (c) sea mayor que 4,952.

25

10.- Un método para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS que comprende los pasos (a) y (d) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

k) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con APS con aterosclerosis o ecodoppler patológico cuando el valor del índice  $C_1$  del paso (d) sea menor o igual que 11,198 y cuando el valor del índice  $C_2$  del paso (d) sea mayor que 7,690.

30

11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-10, donde la muestra biológica aislada del paso (a) es una muestra de plasma, suero u orina, preferiblemente la muestra es de plasma.

35 12.- Un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para detectar los niveles de expresión de los microARNs: miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y miR-15a, tal y como se han definido estos en la reivindicación 1, donde el kit o dispositivo comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto

- 5 de expresión los microARN: miR-124, miR-145, miR-20a, miR-296, miR-34a, miR-374, miR-19b, y miR-15a, y donde:
- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.
  - las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 80 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.
  - los anticuerpos son capaces de unirse a una región formada por cualquiera de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.
- 30 13.- Un microarray que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16.
- 35 14.- Uso del kit o dispositivo tal y como se define en la reivindicación 12 o de un microarray tal y como se define en la reivindicación 13, para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del APS en un individuo o sujeto que sufra potencialmente APS.

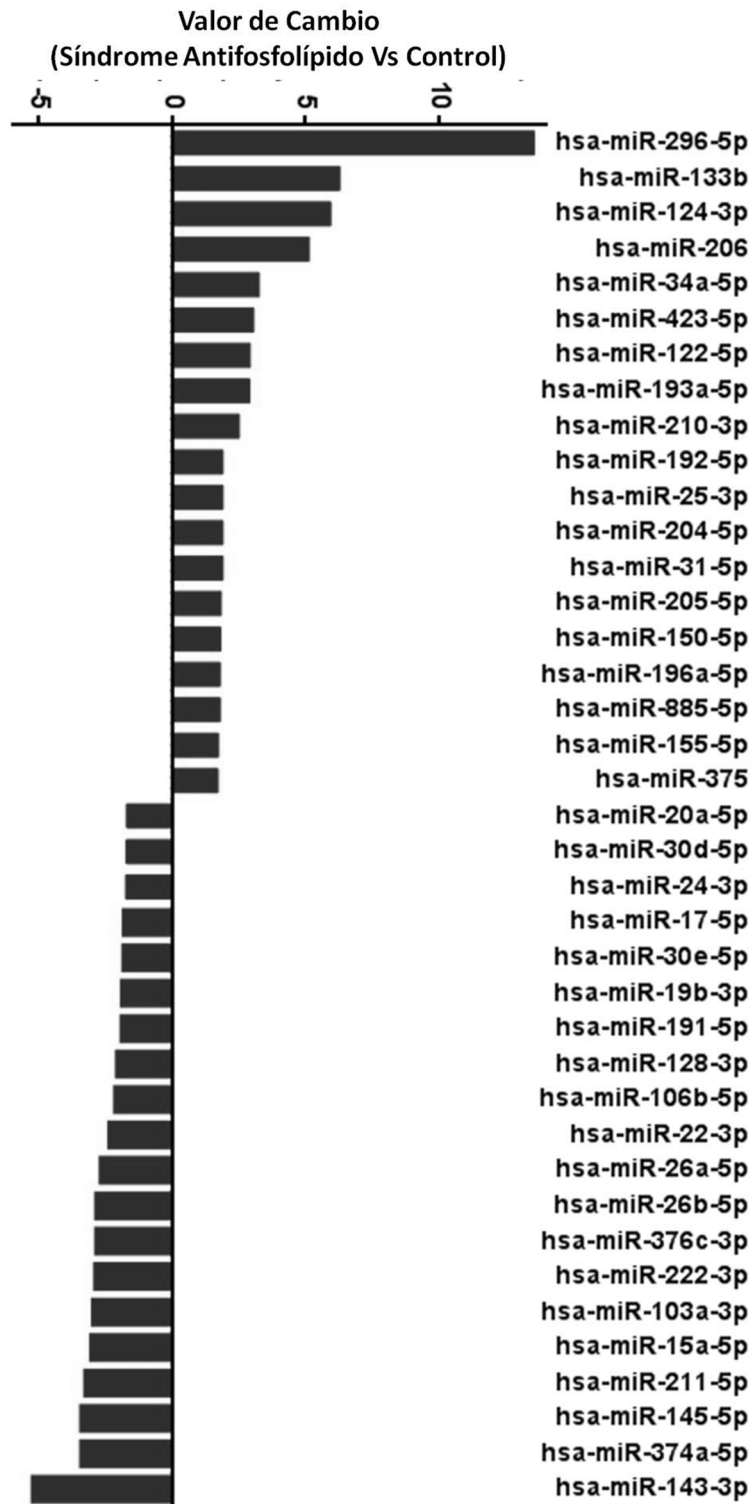


Fig.1 (A)



Top de enfermedades y Biofunciones		
Enfermedades y Trastornos		
Nombre	P-rangovalor	# Moléculas
Enfermedad del Sistema Reproductor	3,44E-02 - 2,94E-12	16
Enfermedades del tejido conectivo	4,42E-02 - 2,84E-13	13
Respuesta inflamatoria	4,42E-02 - 4,48E-13	11
Lesiones del organismo y anomalías	4,64E-02 - 2,84E-13	21
Cáncer	4,64E-02 - 2,84E-13	21

Fig.1 (B)

Firma de miRNAs plasmáticos



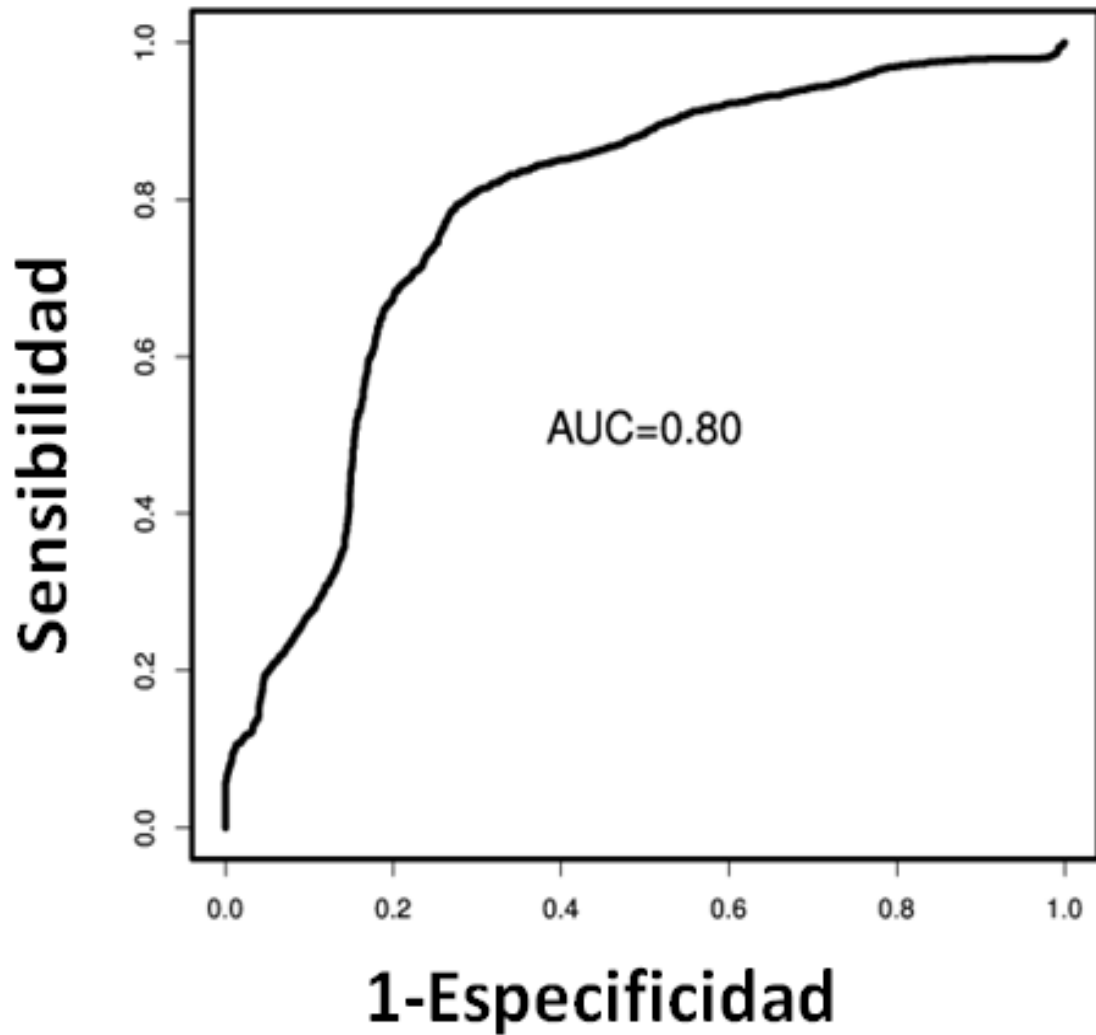
Modelo

$$A = \frac{1}{1 + e^{-\beta_0 - \sum_{i=1}^5 \beta_i X_i}}$$

Enfermedad =  $\begin{cases} p \leq 0.6 \rightarrow \text{Control} \\ p > 0.6 \rightarrow \text{APS} \end{cases}$

$\beta_0 = -7.01449$	$x_1 = -\log_2(\text{miR20a/miR145})$
$\beta_1 = 1.13676$	$x_2 = -\log_2(\text{miR145/miR296})$
$\beta_2 = 0.16051$	$x_3 = -\log_2(\text{miR374/miR34a})$
$\beta_3 = 0.19897$	$x_4 = -\log_2(\text{miR374/miR124})$
$\beta_4 = 0.20980$	$x_5 = \text{Edad del paciente}$
$\beta_5 = 0.07982$	

Fig.2 (A)



<b>Análisis ROC</b>	
<b>Área bajo la curva (AUC)</b>	<b>80%</b>
<b>Sensibilidad</b>	<b>80%</b>
<b>Especificidad</b>	<b>72%</b>
<b>Punto de Corte</b>	<b>0.6</b>

Fig.2 (B)

Firma de miRNAs plasmáticos



Modelo

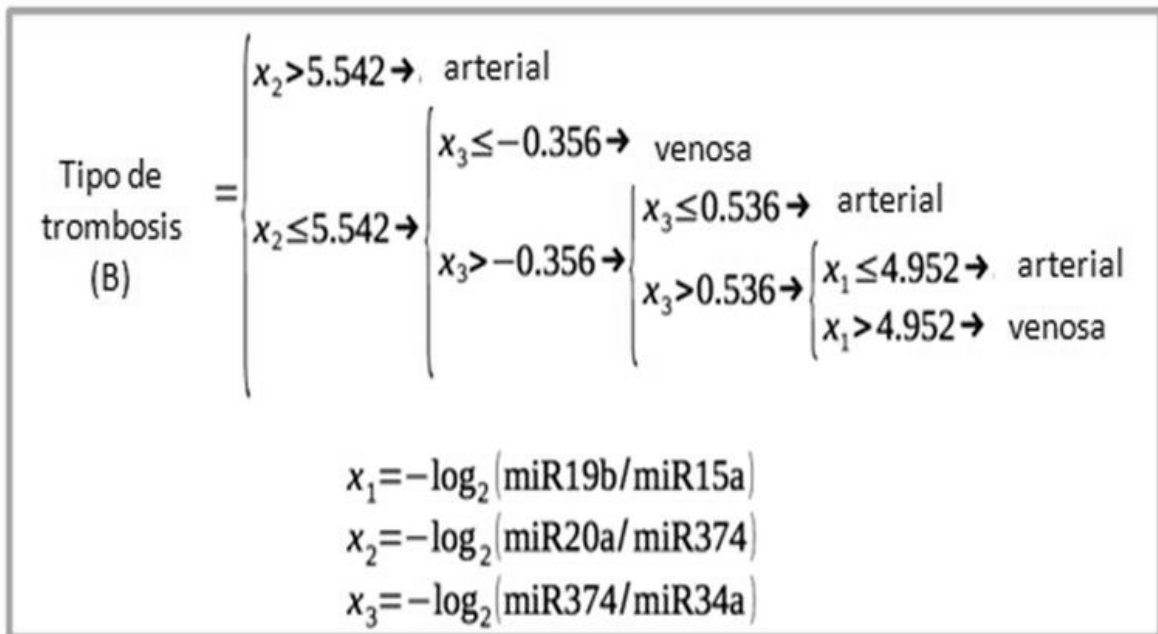
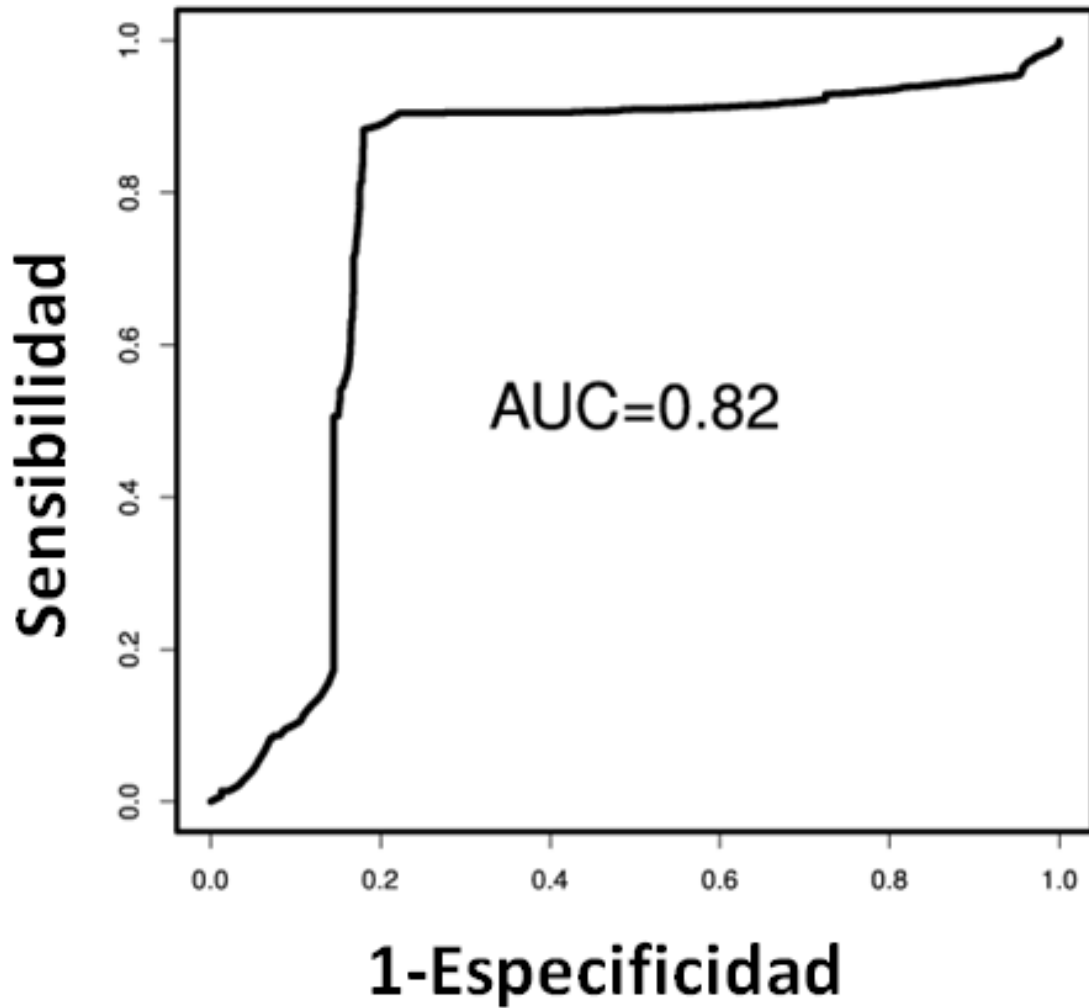
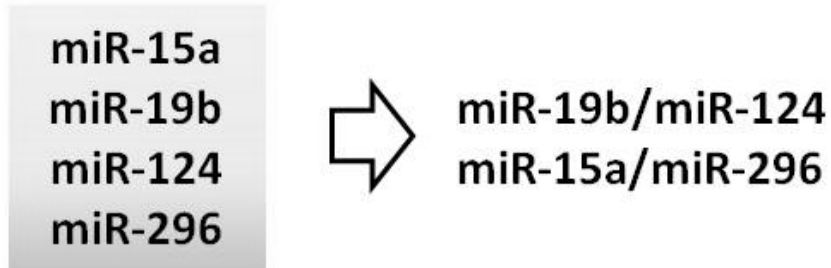


Fig.3 (A)



Análisis ROC	
Área bajo la curva (AUC)	82%
Sensibilidad (%)	90%
Especificidad (%)	80%
<u>Cohen's <math>\kappa</math></u>	71%

Fig.3 (B)

Firma de miRNAs plasmáticosModelo

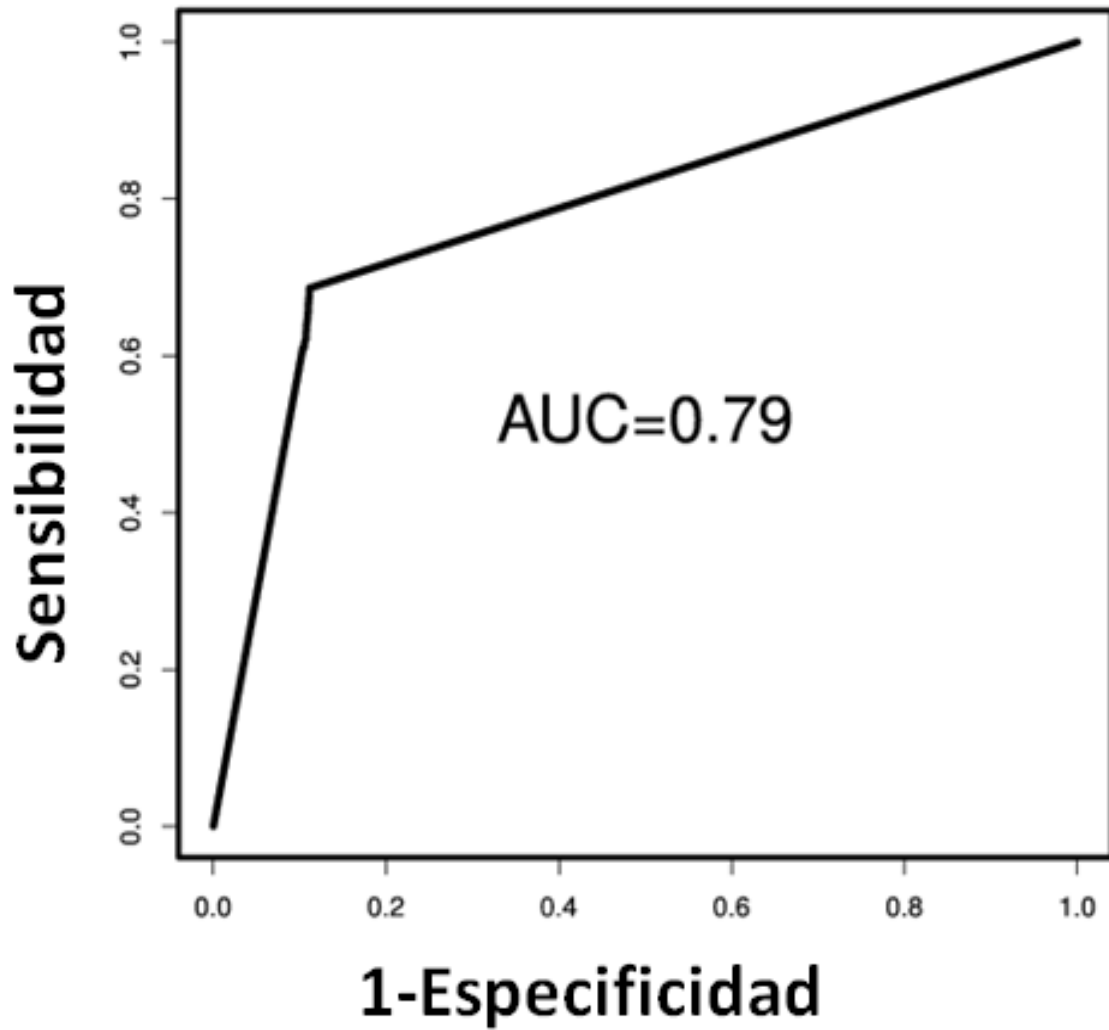
$$\text{Ecodoppler} = \begin{cases} y_1 > 11.198 \wedge y_2 \leq 7.690 \rightarrow \text{Normal} \\ y_1 \leq 11.198 \vee y_2 > 7.690 \rightarrow \text{Patologico} \end{cases}$$

(C)

$$y_1 = -\log_2(\text{miR19b/miR124})$$

$$y_2 = -\log_2(\text{miR15a/miR296})$$

Fig.4 (A)



Análisis ROC	
Área bajo la curva (AUC)	79%
Sensibilidad	71%
Especificidad	88%
<u>Cohen's κ</u>	58%

Fig.4 (B)

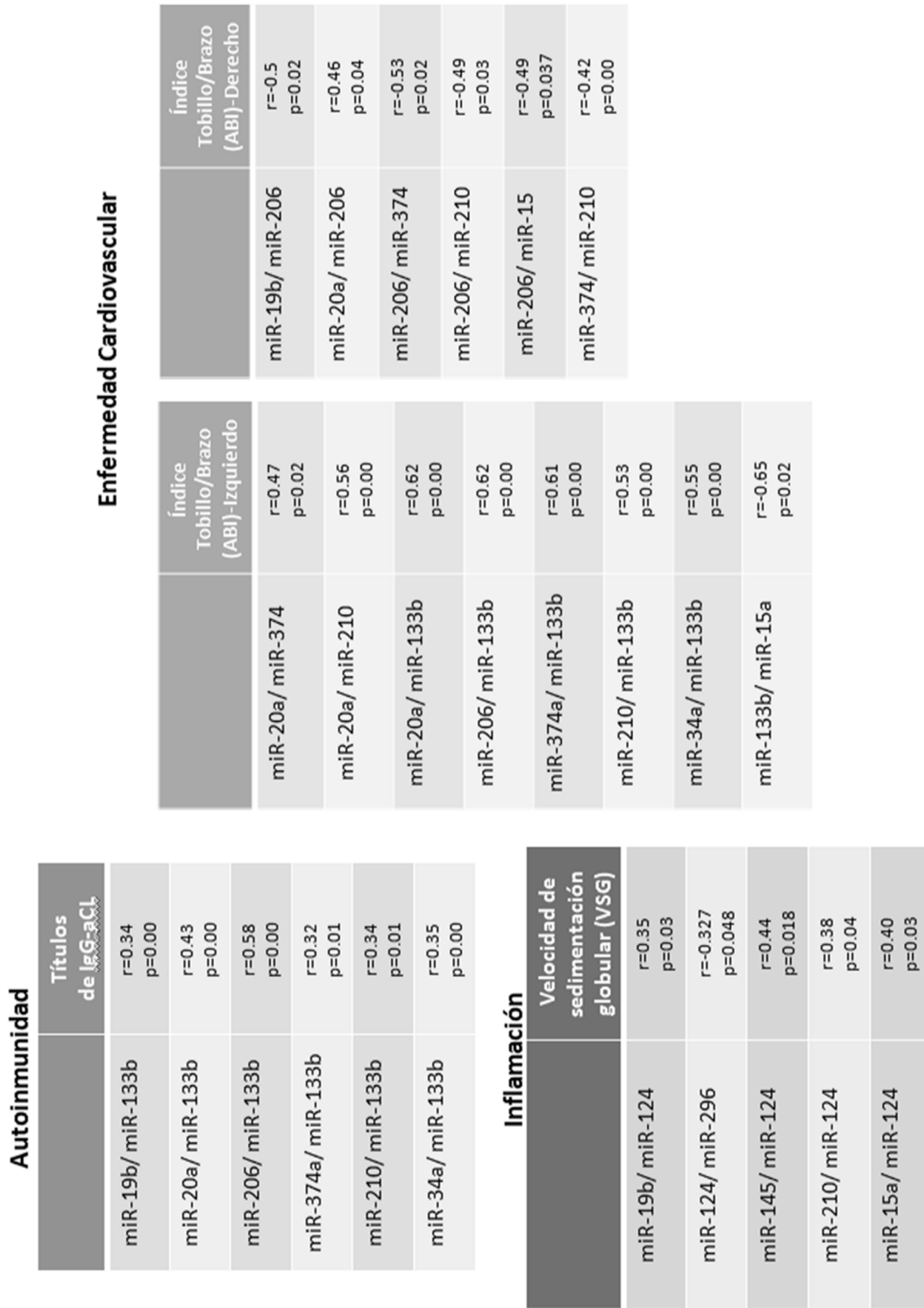


Fig.5



**miRNAs asociados con pérdidas fetales (fetal loss):  
145, 374a, 15a, 133b, 210, 296, 20a, 19b, 124**

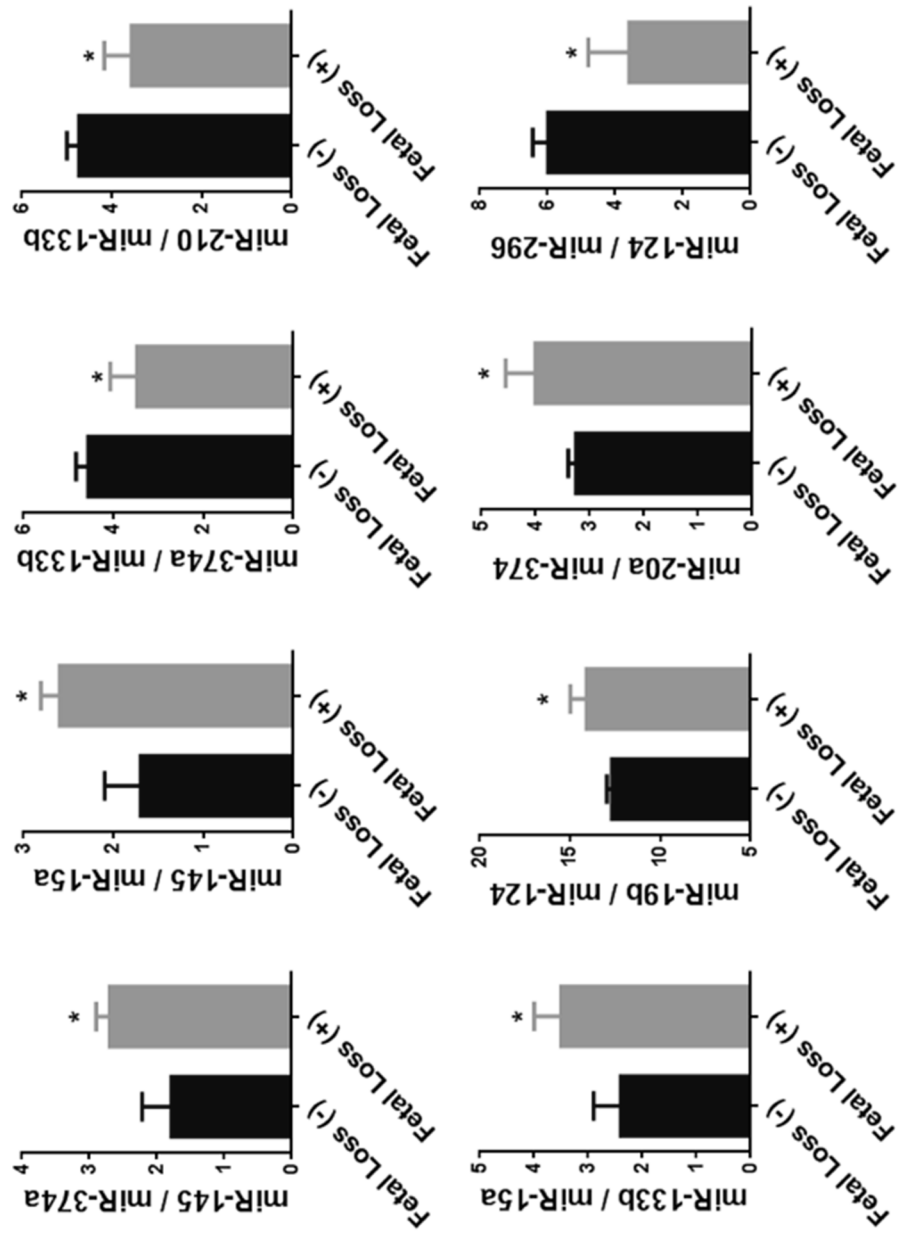


Fig.6 (A)

**miRNAs asociados con aPL:  
20a, 19b, 124**

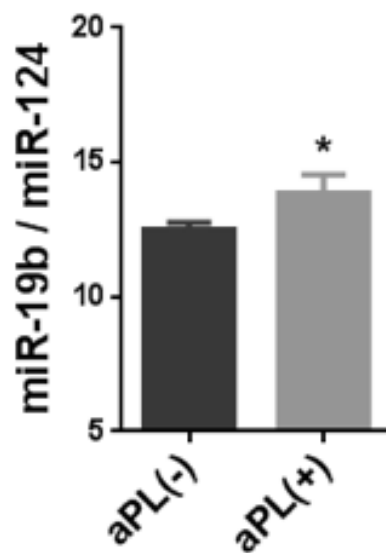
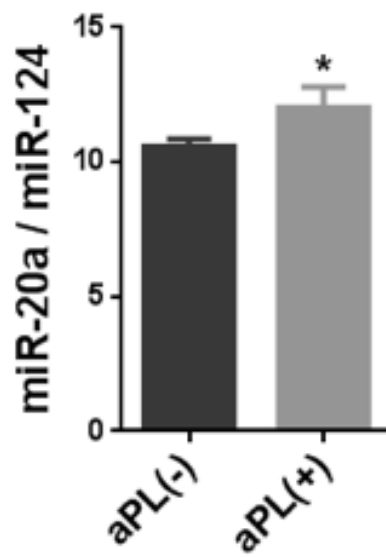


Fig.6 (B)

Lista de Secuencias

<110>	SERVICIO ANDALUZ DE SALUD UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA	
<120>	MicroARNs circulantes como biomarcadores del Síndrome Antifosfolípido Primario	
<130>	FIBICO-15023	
<160>	16	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	85	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	1	
	aggcctctct ctccgtgttc acagcggacc ttgatttaaa tgtccataca attaaggcac	60
	gcggtgaatg ccaagaatgg ggctg	85
<210>	2	
<211>	88	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	2	
	caccttgccc tcacggcca gttttcccag gaatccctta gatgctaaga tggggattcc	60
	tggaaatact gttcttgagg tcatggtt	88
<210>	3	
<211>	71	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	3	
	gtagactaa agtgcttata gtgcaggtag tgtttagtta tctactgcat tatgagcact	60
	taaagtactg c	71
<210>	4	
<211>	80	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	4	
	aggacccttc cagagggccc cccctcaatc ctgttgtgcc taattcagag ggttgggtgg	60
	aggctctcct gaagggctct	80
<210>	5	
<211>	110	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	5	
	ggccagctgt gagtgtttct ttggcagtgt ctagctggt tgttgtgagc aatagtaagg	60
	aagcaatcag caagtatact gccctagaag tgctgcacgt tgtggggccc	110

ES 2 648 638 A1

<210>	6		
<211>	72		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	6	tacatcggcc attataatac aacctgataa gtggttatagc acttatcaga ttgtattgta	60
		attgtctgtg ta	72
<210>	7		
<211>	87		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	7	cactgttcta tggttagttt tgcaggtttg catccagctg tgtgatattc tgctgtgcaa	60
		atccatgcaa aactgactgt ggtagtg	87
<210>	8		
<211>	83		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	8	ccttggagta aagtagcagc acataatggt ttgtggattt tgaaaaggtg caggccatat	60
		tgtgctgcct caaaaataca agg	83
<210>	9		
<211>	20		
<212>	RNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	9	uaaggcacgc ggugaaugcc	20
<210>	10		
<211>	23		
<212>	RNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	10	guccaguuuu cccaggauc ccu	23
<210>	11		
<211>	23		
<212>	RNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	11	uaaagugcuu auagugcagg uag	23
<210>	12		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	12	agggccccc cucaauccug u	21

# ES 2 648 638 A1

<210> 13  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 13  
uggcaguguc uuagcugguu gu 22

<210> 14  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 14  
uuauaaauaca accugauaag ug 22

<210> 15  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 15  
ugugcaaauc caugcaaaac uga 23

<210> 16  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 16  
uagcagcaca uaaugguuug ug 22