

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 133**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2012 PCT/IL2012/000201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12160551**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2012 E 12790197 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2714934**

54 Título: **Métodos y composiciones para determinar insuficiencia cardiaca o un riesgo de insuficiencia cardiaca**

30 Prioridad:

24.05.2011 US 201161489272 P

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

07.03.2019

73 Titular/es:

ROSETTA GENOMICS LTD (50.0%)

10 Plaut Street

76706 Rehovot , IL y

MOR-RESEARCH APPLICATIONS LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

GOREN, YARON y

AMIR, OFER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 703 133 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

Métodos y composiciones para determinar insuficiencia cardiaca o un riesgo de insuficiencia cardiaca

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general a moléculas de microARN asociadas con insuficiencia cardiaca, así como a métodos de diagnóstico de insuficiencia cardiaca crónica.

10 **Antecedentes de la invención**

La insuficiencia cardiaca es un estado fisiopatológico en que el corazón no puede bombear suficiente sangre para cumplir las necesidades de nutrición y oxígeno de los tejidos o de las células metabolizantes. Es una complicación principal en muchas cardiopatías. Los adultos de más de 40 de edad tienen un riesgo durante su vida de desarrollar insuficiencia cardiaca estimado en un 21 % (Lloyd-Jones et al., 2002, *Circulation* 106, 3068- 72), una afección que es responsable de más hospitalizaciones que todas las formas de cáncer combinadas (American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics 2003 Update).

La investigación realizada en el transcurso de los últimos años demostró que el control transcripcional y la expresión génica cardiaca parece desempeñar una función importante en la patogenia y las manifestaciones clínicas de la insuficiencia cardiaca (HF) (Li et al., 2011, *Cardiovasc Res.* (6):498-512).

Específicamente, los estudios recientes demostraron la regulación por disminución del ARN mensajero (ARNm) en pacientes con HF, lo que sugiere la importancia de los mecanismos moleculares que suprimen los niveles en estado constante de ARNm (Kaab et al., 2004, *J Mol Med.* 82: 308-316).

En los últimos años, los microARN (miARN, miR) han surgido como una clase novedosa importante de ARN regulador, que tiene un profundo impacto sobre una amplia serie de procesos biológicos.

Estas moléculas de ARN no codificantes pequeñas (normalmente de 17-24 nucleótidos de longitud) pueden modular los patrones de expresión de proteínas promoviendo la degradación del ARN, inhibiendo la traducción del ARNm y también afectando la transcripción génica. Los miR desempeñan funciones centrales en diversos procesos tales como el desarrollo y la diferenciación, el control de la proliferación celular, la respuesta a sobrecarga y el metabolismo. Se encontró que la expresión de muchos miR estaba alterada en numerosos tipos de cáncer humano, y en algunos casos se han aducido fuertes evidencias de la conjetura de que dichas alteraciones pueden desempeñar una función causante en la progresión del tumor. Actualmente hay aproximadamente 1223 miR humanos conocidos.

Los datos recientes indican que los miR también están asociados a cardiopatía, incluida HF, y eran incluso más sensibles que los ARNm al estado funcional agudo de insuficiencia cardiaca en fase final (Thum et al., 2007, *Circulation.* 116: 258-267; Matkovich et al., 2009, *Circulation.* 119(9):1263-1271).

Los tratamientos actuales para insuficiencia cardiaca incluyen métodos farmacológicos, dispositivos tales como el dispositivo de asistencia ventricular (VAD), tratamiento de resincronización cardiaca (CRT), desfibrilador cardioversor implantable (ICD) que es una pequeña batería y trasplante de corazón. Las estrategias farmacológicas incluyen, aunque sin limitación, el uso de agentes inotrópicos (es decir, compuestos que aumentan la capacidad de contractilidad cardiaca), bloqueante neurohumorales (por ejemplo, beta bloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina), antagonistas de aldosterona, diuréticos y vasodilatadores. Sin embargo, ninguno de estos agentes es completamente eficaz en solitario o en combinación. La disponibilidad de trasplantes es muy limitada, y como muchos individuos que padecen insuficiencia cardiaca están en mal estado de salud, frecuentemente no son buenos candidatos quirúrgicos. Por estas razones, la insuficiencia cardiaca sigue siendo una causa principal de morbilidad y mortalidad, particularmente en el mundo desarrollado. Además, puede ser difícil determinar la etiología precisa de la insuficiencia cardiaca, un factor que impide el desarrollo de tratamientos más específicos. Hay una ausencia general de técnicas de diagnóstico a nivel molecular. Por tanto, hay una necesidad en la técnica del descubrimiento de marcadores de diagnóstico en circulación que reflejen de forma más precisa la predisposición genética de un sujeto a desarrollar HF.

Sumario de la invención

La presente solicitud divulga el descubrimiento de un panel de miR cuyos niveles están aumentados o disminuidos en la circulación de pacientes con HF sistólica crónica. Por consiguiente, se cribó un amplio panel de miR en el suero de pacientes con HF sistólica crónica estables y los resultados se compararon con un grupo de control con coincidencia en edad, género y etnia. Se encontró que una puntuación basada en los niveles de los miR detectados en suero sugiere pacientes con HF y se correlaciona con otros marcadores clínicos de pronóstico conocidos en el grupo de HF.

Los ácidos nucleicos en circulación de líquidos corporales ofrecen oportunidades únicas para el diagnóstico prematuro del riesgo de HF. La presente solicitud divulga secuencias de ácido nucleico específicas para su uso en la

identificación, detección prematura y diagnóstico de HF. Las secuencias de ácido nucleico también pueden usarse como marcadores de pronóstico para la evaluación pronóstica de un sujeto basándose en su patrón de expresión en una muestra biológica. La solicitud divulga además un método de detección o predisposición prematura mínimamente invasiva de HF.

5 La presente invención proporciona un método de diagnóstico del riesgo aumentado de insuficiencia cardíaca crónica en un sujeto, comprendiendo el método: determinar el perfil de expresión de secuencias de microARN en una muestra de suero previamente obtenida de dicho sujeto, comprendiendo dichas secuencias de microARN la SEQ ID NO: 13, o
10 una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con la misma; y comparar dicho perfil de expresión con un perfil de expresión de referencia en el que un nivel relativamente alto de expresión de la secuencia de microARN que comprende la SEQ ID NO: 13 o que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con la misma en el perfil de expresión determinado en la muestra de suero, en comparación con dicho perfil de expresión de referencia, es diagnóstico de riesgo aumentado de insuficiencia cardíaca crónica.

15 De acuerdo con una realización, el perfil de expresión determinado comprende además el nivel de expresión de al menos una secuencia de microARN seleccionada de las SEQ ID NO: 1-12, 14-48 y 94-146, o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas.

20 En una realización adicional, los niveles de expresión relativamente altos de secuencias de microARN seleccionadas de las SEQ ID NO: 1-12, 14-39, 94-97 y 119-122, o secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas, en comparación con el perfil de expresión de referencia, son diagnósticos de riesgo aumentado de insuficiencia cardíaca.

25 En otra realización, los niveles de expresión relativamente bajos de secuencias de microARN seleccionadas de las SEQ ID NO: 40-48, 98-118, 123-146, o secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas, en comparación con el perfil de expresión de referencia, son diagnósticos de riesgo aumentado de insuficiencia cardíaca crónica.

30 De acuerdo con algunas realizaciones, dicha muestra biológica se selecciona de líquido corporal, una línea celular y una muestra tisular. De acuerdo con una realización, la muestra de líquido corporal es una muestra de suero. De acuerdo con otra realización, dicha muestra de líquido corporal es una muestra de sangre.

35 De acuerdo con algunas realizaciones, el método comprende determinar la expresión de al menos dos secuencias de ácido nucleico. De acuerdo con algunas realizaciones, el método comprende además combinar una o más relaciones de expresión.

40 De acuerdo con algunas realizaciones, los niveles de expresión se determinan por hibridación de ácidos nucleicos, amplificación de ácidos nucleicos o una combinación de las mismas. De acuerdo con algunas realizaciones, el método de amplificación de ácidos nucleicos es PCR en tiempo real (RT-PCR). De acuerdo con una realización, dicha PCR en tiempo real es PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR).

45 De acuerdo con algunas realizaciones, el método de RT-PCR comprende cebadores directos e inversos, en el que el cebador directo comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 49-66, 86-89, 147-171, o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas. De acuerdo con algunas realizaciones, el método de PCR en tiempo real comprende además hibridación con una sonda.

50 De acuerdo con algunas realizaciones, la sonda puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-48, 94-146; un fragmento de las mismas y secuencias al menos aproximadamente un 80 % idénticas a las mismas.

De acuerdo con otras realizaciones, la sonda puede comprender una secuencia seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NO: 67-84, 90-93, 172-196; un fragmento de las mismas y una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas.

55 La solicitud divulga además un kit para evaluar la insuficiencia cardíaca en un sujeto; dicho kit comprende una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-48, 94-146; un fragmento de las mismas y secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas. De acuerdo con algunas realizaciones, dicha sonda
60 comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 67-84, 90-93, 172-196; un fragmento de las mismas y secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas. De acuerdo con otras realizaciones, el kit comprende además un cebador directo que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las 49-66, 86-89, 147-171; un fragmento de las mismas y secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas. De acuerdo con otras realizaciones, el kit comprende además un cebador inverso que comprende la SEQ ID NO: 85, un fragmento de la
65 misma y secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad con la misma.

Estas y otras realizaciones de la presente invención llegarán a ser evidentes junto con las figuras, descripción y reivindicaciones siguientes.

Breve descripción de los dibujos

5 Las figuras 1A-1D son presentaciones de gráficas de caja que comparan las distribuciones de la presencia de microARN estadísticamente significativos regulados por aumento ejemplificados: hsa-miR-423-5p (SEQ ID NO: 13) (IA), hsa-miR-320a (SEQ ID NO: 1) (IB), hsa-miR-22 (SEQ ID NO: 14) (1C) y hsa- miR-92b (SEQ ID NO: 15) (ID), en muestras de suero obtenidas del grupo de HF (I) o sujetos sanos (II). Los resultados se basan en PCR en tiempo real, y una señal normalizada mayor indica cantidades mayores de microARN presentes en las muestras.

10 Las gráficas de caja muestran el promedio (línea horizontal), el percentil 25 a 35 (recuadro), alcance de los datos hasta 1,5 veces el intervalo intercuartílico ("bigotes") y valores atípicos (cruces).

15 Las figuras 2A-2D son presentaciones de gráficas de caja que comparan las distribuciones de la expresión (eje de ordenadas) de microARN estadísticamente significativos regulados por disminución ejemplificada: hsa-miR-26a (SEQ ID NO: 40) (2A), hsa-miR-199b-5p (SEQ ID NO: 42) (2B), hsa-miR-33a (SEQ ID NO: 41) (2C) y hsa-miR-27b (SEQ ID NO: 43) (2D), en muestras de suero obtenidas del grupo de HF (I) o sujetos sanos (II). Los resultados se basan en PCR en tiempo real, y una señal normalizada mayor indica cantidades mayores de microARN presentes en las muestras.

20 Las gráficas de caja muestran el promedio (línea horizontal), el percentil 25 a 75 (recuadro), alcance de los datos hasta 1,5 veces el intervalo intercuartílico ("bigotes") y valores atípicos (cruces).

La figura 3 es un diagrama de puntos que muestra que la puntuación de miR (eje de ordenadas) se separa significativamente entre el grupo de HF (I) y el grupo de control (II). La puntuación de miR se calculó para cada muestra como la señal media normalizada-invertida de hsa-miR-423-5p (SEQ ID NO: 13), hsa- miR-320a (SEQ ID NO: 1), hsa-miR-22 (SEQ ID NO: 14) y hsa-miR-92b (SEQ ID NO: 15) y ajustada restando una constante (la puntuación mínima) de modo que el intervalo de puntuaciones empieza en 0.

25 Las líneas horizontales indican los valores promedio que son 2,9 en el grupo de HF y 1,3 en el grupo de control. El valor p para el ensayo de la t de muestras no emparejadas bilateral es 0,0000001.

La figura 4 es una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) para la discriminación de la puntuación de miR entre los grupos de HF y de control. La curva ROC representa la sensibilidad (eje de ordenadas) frente a la tasa de positivos falsos (uno menos la especificidad (eje de abscisas) para diferentes valores de corte de una métrica de diagnóstico, y es una medida del rendimiento de clasificación. El área bajo la curva ROC (AUC) puede usarse para evaluar el rendimiento diagnóstico de la métrica. Un clasificador aleatorio tiene AUC = 0,5, y un clasificador óptimo con sensibilidad y especificidad perfectas de un 100 % tiene AUC = 1. La curva ROC correspondiente tiene AUC = 0,90.

30 La figura 5 es un diagrama que demuestra la correlación significativa entre las puntuaciones de miR dentro del grupo de HF (eje de ordenadas) y los niveles elevados de péptido natriurético cerebral (BNP) en suero (eje de abscisas). Los niveles de BNP para pacientes en el grupo de HF se presentan en escala logarítmica. La correlación de Spearman de los niveles de BNP respecto a la puntuación de miARN es 0,63 (p = 0,003).

La figura 6 es un diagrama de puntos que demuestra la asociación significativa entre las puntuaciones de miR (eje de ordenadas) y los niveles de péptido natriurético cerebral (BNP) en suero (eje de abscisas). Las puntuaciones de miR se compararon entre muestras de pacientes con HF cuyos valores para el parámetro estaban en la mitad superior respecto a las muestras cuyos valores estaban en la mitad inferior. Niveles de BNP elevados se asocian con una puntuación de miARN alta, valor p = 0,002.

35 La figura 7 es un diagrama de puntos que demuestra la asociación significativa entre las puntuaciones de miR (eje de ordenadas) y QRS ancho (eje de abscisas). Valor p = 0,009.

La figura 8 es un diagrama de puntos que demuestra la asociación significativa entre las puntuaciones de miR (eje de ordenadas) y la dimensión diastólica final del ventrículo izquierdo (EDD) (eje de abscisas). Un diámetro diastólico final elevado (EDD) está asociado con una puntuación de miARN alta (p = 0,03).

40 La figura 9 es un diagrama de puntos que demuestra la asociación significativa entre las puntuaciones de miR (eje de ordenadas) y la dimensión de la aurícula izquierda (LAD) (eje de abscisas). Un LAD elevada está asociada con una elevada puntuación de miARN (p = 0,01).

Descripción detallada de la invención

55 La invención se basa en parte en el descubrimiento de que secuencias biomarcadoras específicas (SEQ ID NO: 1-48, 94-146) pueden usarse para la identificación, detección prematura, diagnóstico y pronóstico de insuficiencia cardiaca crónica.

60 Los biomarcadores tienen el potencial de revolucionar el diagnóstico y el tratamiento de diversas afecciones médicas. De forma ideal, los biomarcadores deben muestrearse de una manera mínimamente invasiva. Por lo tanto, el reto de diversos campos de investigación biomédica ha sido identificar biomarcadores en líquidos corporales, tal como suero o sangre. En los últimos años, a quedado claro que hay tanto ADN como ARNm son células presentes en el suero, así como en otros líquidos corporales, y representan biomarcadores potenciales. Sin embargo, el control de las cantidades normalmente pequeñas de estos ácidos nucleicos en los líquidos corporales requiere métodos de detección sensibles, que no son actualmente aplicables clínicamente.

65

La presente invención proporciona un método sensible, específico y preciso que puede usarse para realizar en una detección prematura mínimamente invasiva, el diagnóstico y el pronóstico de insuficiencia cardiaca crónica. Los métodos de la presente invención tienen alta sensibilidad y especificidad.

5 Sorprendentemente, el método anterior permite un ensayo mínimamente invasivo simple, para una fácil detección de cardiopatía crónica en una fase muy temprana con mayor fiabilidad y eficacia, ahorro de tiempo, material y etapas de funcionamiento, así como ahorro de costes y agentes químicos refinados difíciles de obtener.

10 Además, el método de acuerdo con la invención combina las ventajas de una fácil recogida de muestra y la opción de diagnosticar insuficiencia cardiaca crónica en una fase temprana. Siendo un método mínimamente invasivo, en que, por ejemplo, se suministra una muestra de suero, el método tiene un buen potencial de conseguir una alta aceptación entre los sujetos, pudiendo ser dichos sujetos seres humanos o animales, por ejemplo. Por lo tanto, el método puede usarse en ensayos rutinarios, pero también en exámenes médicos profilácticos.

15 Además, la presente solicitud divulga métodos para determinar un plan de tratamiento. Una vez que el profesional sanitario conoce clase de enfermedad a la que pertenece la muestra y, por lo tanto, el individuo, el profesional sanitario puede determinar un plan de tratamiento adecuado para el individuo. Por ejemplo, diferentes clases de cardiopatías a menudo requieren diferentes tratamientos. Como se describe en este documento, los individuos que tienen un tipo particular o clase de cardiopatía pueden beneficiarse de un ciclo diferente de tratamiento, que un individuo que tiene un tipo diferente o clase de cardiopatía. El diagnóstico y comprensión apropiados de la clase de cardiopatía de un individuo permite un mejor tratamiento y pronóstico más satisfactorio.

Definiciones

25 Antes de divulgar y describir las presentes composiciones y métodos, debe entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitante. Debe apreciarse que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno", "una" y "el", "la" incluyen referencias en plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

30 Para recitar intervalos numéricos en este documento, cada número intermedio entre medias con el mismo grado de precisión se contempla explícitamente. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, los números 7 y 8 se contemplan además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0, el número 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0 se contemplan explícitamente.

35 Aproximadamente

Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Antisentido

40 El término "antisentido", como se usa en este documento, se refiere a secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de ADN o ARN específica. La expresión "hebra de antisentido" se usa en referencia a una hebra de ácido nucleico que es complementaria a la hebra "codificante". Las moléculas de antisentido pueden producirse por cualquier método, incluyendo síntesis por ligamiento del gen o genes de interés en una orientación inversa a un promotor vírico que permite la síntesis de una hebra complementaria. Una vez introducida en una célula, esta hebra transcrita combina con secuencias naturales producidas por la célula para formar dúplex. Estos dúplex entonces bloquean la transcripción o la traducción adicional. De esta manera, pueden generarse fenotipos mutantes.

Adherido

50 "Adherido" o "inmovilizado", como se usa en este documento, se refiere a una sonda y un soporte sólido y puede indicar que la unión entre la sonda y el soporte sólido es suficiente para que sea estable en condiciones de unión, lavado, análisis y eliminación. La unión puede ser covalente o no covalente. Pueden formarse enlaces covalentes directamente entre la sonda y el soporte sólido o pueden formarse por un reticulante o mediante la inclusión de un grupo reactivo específico en el soporte sólido o la sonda, o ambos. La unión no covalente puede ser una o más de interacciones electrostáticas, hidrófilas e hidrófobas. Se incluye en la unión no covalente la adhesión covalente de una molécula, tal como estreptavidina, al soporte y la unión no covalente de una sonda biotinilada a la estreptavidina. La inmovilización también puede implicar una combinación de interacciones covalentes y no covalentes.

60

Muestra biológica

"Muestra biológica", como se usa en este documento, significa una muestra de tejido o líquido biológico que comprende ácidos nucleicos. Dichas muestras incluyen, aunque sin limitación, tejido o líquido aislado de sujetos. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como muestras de biopsia y autopsia, muestras FFPE, secciones congeladas recogidas con fines histológicos, sangre, plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, moco, cabello y piel. Las muestras biológicas también incluyen explantes y cultivos celulares primarios y/o transformados derivados de tejidos animales o del paciente.

Las muestras biológicas también pueden ser sangre, una fracción sanguínea, orina, fusiones, líquido ascítico, saliva, líquido cefalorraquídeo, secreciones cervicales, secreciones vaginales, secreciones endometriales, secreciones gastrointestinales, secreciones bronquiales, esputo, línea celular, muestra tisular o secreciones de mama. Una muestra biológica puede proporcionarse retirando una muestra de células de un animal, pero también puede conseguirse usando células aisladas previamente (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento y/o con otro fin), o realizando los métodos descritos en este documento *in vivo*. También pueden usarse tejidos de archivo, tales como los que tienen un historial de tratamiento o de resultados.

Clasificación

"Clasificación", como se usa en este documento, se refiere a un procedimiento y/o algoritmo en que artículos individuales se colocan en grupos o clases basándose en la información cuantitativa sobre una o más características inherentes en los artículos (mencionados como rasgos, variables, caracteres, características, etc.) y basándose en un modelo estadístico y/o un conjunto capacitado de artículos marcados previamente. De acuerdo con una realización, clasificación significa la determinación del tipo de cardiopatía.

Complemento

"Complemento" o "complementario", como se usa en este documento, significa emparejamiento de bases de Watson-Crick (por ejemplo, A-T/U y C-G) o de Hoogsteen entre nucleótidos o análogos nucleotídicos de moléculas de ácido nucleico. Un complemento completo o complementariedad completa puede indicar un emparejamiento de bases 100 % complementario entre nucleótidos o análogos nucleotídicos de moléculas de ácido nucleico.

C_T

Las señales C_T representan el primer ciclo de PCR donde la amplificación cruza un umbral (umbral de ciclo) de fluorescencia. Por consiguiente, valores bajos de C_T representan alta abundancia o niveles de expresión del microARN.

En algunas realizaciones, la señal C_T de PCR se normaliza de modo que la C_T normalizada permanece invertida a partir del nivel de expresión. En otras realizaciones, la señal C_T de PCR puede normalizarse y después invertirse de modo que un C_T invertido normalizado bajo representa baja abundancia o niveles de expresión del microARN.

Detección

"Detección" significa detectar la presencia de un componente en una muestra. Detección también significa detectar la ausencia de un componente. Detección también significa medir el nivel de un componente, cuantitativa o cualitativamente.

Expresión diferencial

"Expresión diferencial" significa diferencias cualitativas o cuantitativas en los patrones temporales y/o celulares de expresión génica dentro y entre células y el tejido. Por tanto, un gen expresado de forma diferencial puede tener cualitativamente su expresión alterada, incluyendo una activación o inactivación en, por ejemplo, tejido normal frente a enfermo. Los genes pueden activarse o desactivarse en un estado particular, respecto a otro estado, permitiendo de este modo la comparación de dos o más estados. Un gen regulado cualitativamente puede mostrar un patrón de expresión dentro de un estado o tipo celular que puede ser detectable por técnicas convencionales. Algunos genes pueden expresarse en un estado tipo celular, pero no en ambos. Como alternativa, la diferencia en la expresión puede ser cuantitativa, por ejemplo, en que la expresión está modulada, regulada por aumento, que provoca una cantidad aumentada de transcrito, o regulada por disminución, que provoca una cantidad disminuida de transcrito. El grado al que difiere la expresión únicamente tiene que ser suficientemente grande para cuantificarse mediante técnicas convencionales de caracterización tales como matrices de expresión, PCR con transcriptasa inversa cuantitativa, análisis de Northern, PCR en tiempo real, hibridación *in situ* y protección de RNasa.

Perfil de expresión

La expresión "perfil de expresión" se usa ampliamente para incluir un perfil de expresión genómica, por ejemplo, un

perfil de expresión de microARN. Los perfiles pueden generarse por cualquier medio conveniente para determinar un nivel de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, hibridación cuantitativa de microARN, microARN marcado, microARN amplificado, ADNc, etc., PCR cuantitativa, ELISA para cuantificación y similares, y permite el análisis de la expresión génica diferencial entre dos muestras. Se ensaya una muestra de tumor de un sujeto o paciente, por ejemplo, células o colecciones de las mismas, por ejemplo, tejidos. Las muestras se recogen por cualquier método conveniente, conocido en la técnica. Las secuencias de ácido nucleico de interés son secuencias de ácido nucleico que se encuentra que son predictivas, incluyendo las secuencias de ácido nucleico proporcionadas anteriormente, donde el perfil de expresión puede incluir datos de expresión de 5, 10, 20, 25, 50, 100 o más, incluyendo todas las secuencias de ácido nucleico enumeradas. De acuerdo con algunas realizaciones, la expresión "perfil de expresión" significa medir la abundancia de las secuencias de ácido nucleico en las muestras medidas.

Relación de expresión

"Relación de expresión", como se usa en este documento, se refiere a niveles de expresión relativa de dos o más ácidos nucleicos determinados detectando los niveles de expresión relativa de los ácidos nucleicos correspondientes en una muestra biológica.

FDR

Cuando se realizan múltiples ensayos estadísticos, por ejemplo, en la comparación de la señal entre dos grupos en múltiples características de datos, hay una probabilidad cada más alta de obtener resultados positivos falsos, por diferencias aleatorias entre los grupos que pueden alcanzar niveles que de lo contrario se considerarían estadísticamente significativos. Para limitar la proporción de dichos descubrimientos falsos, se define la significación estadística únicamente para características de datos en que las diferencias alcanzaban un valor p (por ensayo de la t bilateral) por debajo de un umbral, que depende de la cantidad de ensayos realizados y la distribución de los valores-p obtenidos en estos ensayos.

Fragmento

"Fragmento" se usa en este documento para indicar una parte que no es de longitud completa de un ácido nucleico o polipéptido. Por tanto, un fragmento es sí mismo también un ácido nucleico o polipéptido, respectivamente.

Gen

"Gen", como se usa en este documento, puede ser un gen natural (por ejemplo, genómico) o sintético que comprende secuencias reguladoras de la transcripción y/o la traducción y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones, secuencias no traducidas 5' y 3'). La región codificante de un gen puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos o un ARN funcional, tal como ARNt, ARNr, ARN catalítico, ARNip, miARN o ARN de antisentido. Un gen también puede ser un ARNm o ADNc correspondiente a las regiones codificantes (por ejemplo, exones y miARN) que comprenden opcionalmente secuencias no traducidas 5' o 3' unidas a las mismas. Un gen también puede ser una molécula de ácido nucleico amplificada producida *in vitro* que comprende todo o una parte de la región codificante y/o secuencias no traducidas 5' o 3' unidas a la misma.

Agente de unión al surco/ agente de unión al surco menor (MGB)

"Agente de unión al surco" y/o "agente de unión al surco menor" pueden usarse indistintamente y se refieren a moléculas pequeñas que se ajustan en el surco menor del ADN bicatenario, normalmente de una manera específica de secuencia. Los agentes de unión al surco menor pueden ser moléculas planas y largas que pueden adoptar una forma de tipo media luna y, por tanto, se ajustan exactamente en el surco menor de una doble hélice, a menudo desplazando el agua. Las moléculas de unión al surco menor normalmente pueden comprender varios anillos aromáticos conectados por enlaces con libertad de torsión tales como anillos de furano, benceno o pirrol. Los agentes de unión al surco menor pueden ser antibióticos tales como netropsina, distamicina, Berenil, pentamidina y otras diamidinas aromáticas, Hoechst 33258, SN 6999, fármacos antitumorales aureólicos tales como cromomicina y mitranmicina, CC-1065, tripéptido de dihidrociclopirroloindol (DPI3), 1,2-dihidro-(3H)-pirrolo[3,2-e]indol-7-carboxilato (CDPI3) y compuestos relacionados y análogos, incluyendo los descritos en *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2.^a ed., Blackburn and Gait, eds., Oxford University Press, 1996, y la solicitud publicada PCT n.º WO 03/078450. El agente de unión al surco menor puede ser un componente de un cebador, una sonda, un complemento de marca de hibridación o combinaciones de los mismos. Los agentes de unión al surco menor pueden aumentar la T_M del cebador o de una sonda a la que están unidos, permitiendo que dichos cebadores o sondas hibriden de forma eficaz a temperaturas mayores.

Cardiopatía

Como se usa en este documento, cardiopatía se refiere a los siguientes ejemplos no limitantes: insuficiencia cardiaca (congestiva); cardiomiopatías, tales como cardiomiopatía isquémica, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía vírica, cardiomiopatía mediada por

5 taquicardia, cardiomiopatía inducida por estrés (takotsubo), cardiomiopatía amiloide, displasia de ventrículo derecho arritmogénica o cardiomiopatías no clasificadas, por ejemplo, falta de compactación del ventrículo izquierdo o fibroelastosis de endocardio; o cardiopatía valvular, tal como estenosis aortica, regurgitación aortica, estenosis mitral, regurgitación mitral, prolapso mitral, estenosis pulmonar, regurgitación pulmonar, estenosis tricúspide o regurgitación tricúspide.

Insuficiencia cardiaca

10 Como se usa en este documento, la expresión "insuficiencia cardiaca" se refiere ampliamente a cualquier afección que reduzca la capacidad del corazón de bombear sangre o bombear sangre con presiones de llenado elevadas. Como resultado, se desarrolla congestión y edema en los tejidos. Muy frecuentemente, la insuficiencia cardiaca está causada por capacidad disminuida de contracción del miocardio, como resultado de un flujo de sangre coronaria reducido; sin embargo, muchos otros factores pueden provocar insuficiencia cardiaca, incluyendo daño a las válvulas cardiaca, deficiencia de vitaminas y enfermedad primaria del músculo cardiaco.

15 De acuerdo con algunas realizaciones, dicha insuficiencia cardiaca se refiere a insuficiencia cardiaca con función sistólica conservada (HFPSF).

Identidad

20 "Idéntico" o "identidad", como se usan en este documento en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, significa que las secuencias tienen un porcentaje especificado de restos que son iguales sobre una región especificada. El porcentaje puede calcularse alineando de forma óptima las dos secuencias, comparando las dos secuencias sobre la región especificada, determinando la cantidad de posiciones en que existe un resto idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la región especificada y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. En casos donde las dos secuencias son de longitudes diferentes o la alineación produce uno o más extremos escalonados y la región especificada de comparación incluye únicamente una sola secuencia, los restos de la secuencia única se incluyen en el denominador, pero no el numerador del cálculo. Cuando se compara ADN y ARN, la timina (T) y el uracilo (U) pueden considerarse equivalentes. La identidad puede realizarse de forma manual o usando un algoritmo informático de secuencias tales como BLAST o BLAST 2.0.

Detección *in situ*

35 "Detección *in situ*", como se usa en este documento, significa la detección de la expresión o los niveles de expresión en el sitio original que en la presente significa en una muestra tisular tal como biopsia.

Marcador

40 "Marcador", como se usa en este documento, significa una composición detectable por medio espectroscópico, fotoquímico, bioquímico, inmunoquímico, químico u otro medio físico. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, tintes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, como se usa habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y otras entidades que pueden hacerse detectables. Un marcador puede incorporarse en ácidos nucleicos y proteínas en cualquier posición.

Ácido nucleico

50 "Ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido", como su usan en este documento, significa al menos dos nucleótidos unidos covalentemente juntos. La representación de una única hebra también define la secuencia de la hebra complementaria. Por tanto, un ácido nucleico también abarca la hebra complementaria de una hebra individual representada. Muchas variantes de un ácido nucleico pueden usarse para el mismo fin como un ácido nucleico dado. Por tanto, un ácido nucleico también abarca ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de los mismos. Una hebra individual proporciona una sonda que puede hibridar con una secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas. Por tanto, un ácido nucleico también abarca una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas.

60 Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener partes de secuencia tanto bicatenaria como monocatenaria. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo- y ribonucleótidos, y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes.

65 Un ácido nucleico generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque pueden incluirse análogos de ácido nucleico que pueden tener al menos un enlace diferente, por ejemplo, fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato o enlaces O-metilfosforoamidita y cadenas principales y enlaces de ácido péptido nucleico. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positivas; cadenas principales no iónicas y cadenas principales sin ribosa,

incluyendo las descritas en las patentes de Estados Unidos n.º 5 235 033 y 5 034 506. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más nucleótidos que no son de origen natural o están modificados también se incluyen dentro de la definición de ácidos nucleicos. El análogo nucleotídico modificado puede estar ubicado, por ejemplo, en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico. Los ejemplos representativos de análogos nucleotídicos pueden seleccionarse de ribonucleótidos con azúcar o cadena principal modificada. Debe apreciarse, sin embargo, que también los ribonucleótidos con núcleo base modificada, es decir, ribonucleótidos, que contienen una nucleobase que no es de origen natural en lugar de una nucleobase de origen natural tal como uridinas o citidinas modificadas en la posición 5, por ejemplo, 5-(2-amino) propil uridina, 5-bromo uridina; adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, por ejemplo, 8-bromo guanosina; desazanucleótidos, por ejemplo, 7- desaza-adenosina; nucleótidos O- y N-alquilados, por ejemplo, N6-metil adenosina son adecuados. El grupo 2'-OH- puede remplazarse por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en el que R es alquilo, alqueno o alquino C₁-C₆, y halo es F, Cl, Br o I. Los nucleótidos modificados también incluyen nucleótidos conjugados con colesterol mediante, por ejemplo, un enlace hidroxiprolinol como se describe en Krutzfeldt et al., Nature 438:685-689 (2005) y Soutschek et al., Nature 432:173-178 (2004). Las modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato pueden hacerse por diversas razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos, para potenciar la difusión a través de membranas celulares o como sondas en un biochip. La modificación de la cadena principal también puede potenciar la resistencia a la degradación, tal como en el entorno endocítico riguroso de las células. La modificación de la cadena principal también puede reducir la eliminación del ácido nucleico por los hepatocitos, tal como en el hígado. Pueden prepararse mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos; como alternativa, pueden prepararse mezclas de diferentes análogos de ácido nucleico y mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos.

Sonda

"Sonda", como se usa en este documento, significa un oligonucleótido que puede unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria mediante uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente mediante emparejamiento de bases complementarias, habitualmente mediante formación de enlaces de hidrógeno. Las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Puede haber muchísimos emparejamientos incorrectos de pares de bases que impedirá la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios descritos en este documento. Sin embargo, si la cantidad de mutaciones es tan grande que no se puede producir hibridación incluso en las condiciones de hibridación menor rigurosas, la secuencia no es una secuencia diana complementaria. Una sonda puede ser monocatenaria o parcialmente monocatenaria y parcialmente bicatenaria. El tipo de hebra de la sonda viene dictaminada por la estructura, composición y propiedades de la secuencia diana. Las sondas pueden marcarse directamente o marcarse indirectamente tal como con biotina a la que posteriormente se puede unir un complejo de estreptavidina.

Perfil de expresión de referencia

Como se usa en este documento, la expresión "perfil de expresión de referencia" se refiere a un valor de expresión estándar con el que se comparan los valores medidos para determinar la detección de un sujeto con una cardiopatía. La referencia puede basarse en una puntuación métrica combinada.

Sensibilidad

"Sensibilidad", usada en este documento puede significar una medida estadística de lo bien que un ensayo de clasificación binario identifica correctamente una afección, por ejemplo, la frecuencia con que clasifica correctamente una cardiopatía en el tipo correcto. La sensibilidad para la clase A es la proporción de casos que se determinan perteneciente a la clase "A" por el ensayo de los casos que están en la clase "A", como se determina por algún valor absoluto o de referencia.

Especificidad

"Especificidad" usada en este documento puede significar una medida estadística de lo bien que un ensayo de clasificación binario identifica correctamente una afección, por ejemplo, la frecuencia con que clasifica correctamente una cardiopatía en el tipo correcto. La especificidad para la clase A es la proporción de casos que se determinan pertenecientes a la clase "que no es A" por el ensayo de los casos que están en la clase "que no es A", como se determina por algún valor absoluto o de referencia.

Muestra patrón

Una "muestra patrón" se refiere a una muestra que es representativa de un estado sin enfermedad, particularmente un estado en que está ausente cardiopatía o cualquier otra afección asociada (es decir, un estado saludable). A modo de ejemplo, la muestra patrón puede ser una muestra biológica, obtenida de un sujeto sano de edad similar que el sujeto del que se proporciona diagnóstico o pronóstico. Una muestra patrón puede ser una muestra compuesta, en la los datos obtenidos de las muestras biológicas de varios sujetos sanos (es decir, sujetos de control que tienen síntomas

de insuficiencia cardiaca) están promediados, creando de ese modo la muestra compuesta.

Condiciones de hibridación rigurosas

5 "Condiciones de hibridación rigurosas", como se usa en este documento, significa condiciones en las que una primera
 secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, sonda) hibridará con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo,
 diana), tal como en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y
 serán diferentes en diferentes circunstancias. Las condiciones rigurosas pueden seleccionarse para que sean
 10 aproximadamente 5-10 °C inferiores a los puntos de fusión térmico (T_M) para la secuencia específica a un pH de fuerza
 iónica definida. La T_M puede ser la temperatura (a fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la
 que un 50 % de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (como las
 secuencias dianas están presentes en exceso, a T_M, un 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio).

15 Las condiciones rigurosas pueden ser aquellas en que la concentración salina es de menos de aproximadamente
 1,0 M de iones sodio, tal como aproximadamente 0,01-1,0 M de concentración de iones sodio (u otras sales) a pH 7,0
 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, aproximadamente
 10-50 nucleótidos) y al menos de aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, de más de
 aproximadamente 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes
 20 desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al
 menos 2 a 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas a modo de ejemplo incluyen las
 siguientes: formamida al 50 %, SSC 5x y SDS al 1 %, incubación a 42 °C o SSC 5x, SDS al 1 %, incubación a 65 °C,
 con lavado en SSC 0,2x y SDS al 0,1 % a 65 °C.

Sustancialmente complementario

25 "Sustancialmente complementario", como se usa en este documento, significa que una primera secuencia es al menos
 un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica al complemento de una segunda
 secuencia sobre una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50,
 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleótidos, o que las dos secuencias hibridan en condiciones de
 30 hibridación rigurosas.

Sustancialmente idéntico

35 "Sustancialmente idéntico", como se usa en este documento, significa que una primera y una segunda secuencia son
 al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas sobre una región de 8,
 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95,
 100 o más nucleótidos o aminoácidos, o con respecto a ácidos nucleicos, si la primera secuencia es sustancialmente
 complementaria al complemento de la segunda secuencia.

Sujeto

40 Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero, incluyendo tanto seres humanos como
 otros mamíferos. Los métodos de la presente invención se aplican preferiblemente a sujetos humanos.

Ácido nucleico diana

45 "Ácido nucleico diana", como se usa en este documento, significa un ácido nucleico o variante del mismo que puede
 unirse por otro ácido nucleico. Un ácido nucleico diana puede ser una secuencia de ADN. El ácido nucleico diana
 puede ser ARN. El ácido nucleico diana puede comprender un ARNm, ARNt, ARNhc, ARNip o ARN que interactúa
 50 con Piwi, o un pri-miARN, pre-miARN, miARN o anti-miARN.

El ácido nucleico diana puede comprender un sitio de unión a miARN diana o una variante del mismo. Una o más
 sondas pueden unirse al ácido nucleico diana. El sitio de unión diana puede comprender 5- 100 o 10-60 nucleótidos.
 El sitio de unión diana puede comprender un total de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,
 55 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30-40, 40-50, 50-60, 61, 62 o 63 nucleótidos. La secuencia del sitio diana puede comprender al
 menos 5 nucleótidos de la secuencia de un sitio de unión a miARN diana divulgado en las patentes de Estados Unidos
 US 7 825 229 o US 7 642 348.

Muestra tisular

60 Como se usa en este documento, una muestra tisular es tejido obtenido de una biopsia de tejido usando métodos bien
 conocidos para los expertos en las materias médicas relacionadas. Los métodos para obtener la muestra de la biopsia
 incluyen reparto burdo de una masa, microdissección, microdissección basada en láser u otros métodos de separación
 celular conocidos en la técnica.

Variante

"Variante", como se usa en este documento, que se refiere a un ácido nucleico significa (i) una parte de una secuencia de nucleótidos mencionada; (ii) el complemento de una secuencia de nucleótidos mencionada o parte de la misma; (iii) un ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a un ácido nucleico mencionado o el complemento del mismo; o (iv) un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con el ácido nucleico mencionado, complemento del mismo, o una secuencia sustancialmente idéntica al mismo.

Tipo silvestre

Como se usa en este documento, la expresión secuencia "de tipo silvestre" se refiere a una secuencia codificante, una no codificante o una de conexión que es una forma alélica de secuencia que realiza la función natural o normal para esa secuencia. Las secuencias de tipo silvestre incluyen múltiples formas alélicas de una secuencia afín, por ejemplo, múltiples alelos de una secuencia de tipo silvestre pueden codificar cambios silenciosos o conservativos para la proteína que codifica una secuencia codificante.

La presente invención emplea miARN para la identificación, clasificación y diagnóstico de cardiopatía.

Procesamiento de microARN

Un gen que codifica un microARN (miARN) puede transcribirse dando lugar a la producción de un miARN precursor conocido como pri-miARN. El pri-miARN puede ser parte de un ARN policistrónico que comprende múltiples pri-miARN. El pri-miARN puede formar una estructura de horquilla con un tallo y un bucle. El tallo puede comprender bases emparejadas incorrectamente.

La estructura de horquilla del pri-miARN puede reconocerse por Drosha, que es una endonucleasa RNasa III. Drosha puede reconocer bucles terminales en el pri-miARN y escindir aproximadamente dos giros helicoidales en el tallo para producir un precursor de 60-70 nucleótidos conocido como pre-miARN. Drosha puede escindir el pri-miARN con un corte escalonado típico de las endonucleasas RNasa III que produce un pre-miARN de tallo y bucle con un fosfato 5' y un saliente de ~2 nucleótidos 3'. Aproximadamente un giro helicoidal del tallo (~10 nucleótidos) que se extiende más allá del sitio de escisión de Drosha puede ser esencial para el procesamiento eficaz. El pre-miARN después puede transportarse activamente desde el núcleo hasta el citoplasma mediante Ran-GTP y el receptor de exportación Exportina-5.

El pre-miARN puede reconocerse por Dicer, que es también una endonucleasa RNasa III. Dicer puede reconocer el tallo bicatenario del pre-miARN. Dicer también puede reconocer el fosfato 5' y el saliente 3' en la base del tallo y bucle. Dicer puede escindir el bucle terminal a dos giros helicoidales de la base del tallo y bucle dejando un fosfato 5' adicional y un saliente de ~2 nucleótidos 3'. La doble hélice de tipo ARN_{II} resultante, que puede comprender emparejamientos incorrectos, comprende el miARN maduro y un fragmento de tamaño similar conocido como miARN*. El miARN y miARN* pueden obtenerse de brazos opuestos del pri-miARN y pre-miARN. Pueden encontrarse secuencias de miARN* en colecciones de miARN clonados, pero normalmente a menor frecuencia que los miARN.

Aunque está inicialmente presente como una especie bicatenaria con miARN*, el miARN finalmente puede llegar a incorporarse como un ARN monocatenario en un complejo ribonucleoproteínico conocido como complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Diversas proteínas pueden formar el RISC, lo que puede dar lugar a variabilidad en la especificidad por dúplex de miARN/miARN*, el sitio de unión del gen diana, la actividad del miARN (represión o activación), y la hebra del dúplex de miARN/miARN* que se carga en el RISC.

Cuando la hebra de miARN del dúplex de miARN:miARN* se carga en el RISC, el miARN* puede retirarse y degradarse. La hebra del dúplex de miARN:miARN* que se carga en el RISC puede ser la hebra cuyo extremo 5' es empareja menos fuertemente. En casos donde ambos extremos del miARN:miARN* tienen emparejamiento 5' casi equivalente, tanto el miARN como el miARN* pueden tener actividad de silenciamiento.

El RISC puede identificar ácidos nucleicos diana basándose en los altos niveles de complementariedad entre el miARN y el ARNm, especialmente en los nucleótidos 2-7 del miARN. Se ha informado únicamente de un caso en animales donde la interacción entre el miARN y su diana era a lo largo de la longitud completa del miARN. Esto se mostró para mir-196 y Hox B8 y se mostró además que mir-196 media la escisión del ARNm de Hox B8 (Yekta *et al.* 2004, Science 304-594). Por lo demás, dichas interacciones se conocen únicamente en plantas (Bartel y Bartel 2003, Plant Physiol 132-709).

Varios estudios han estudiado el requisito de emparejamiento de bases entre el miARN y su ARNm diana para conseguir la inhibición eficaz de la traducción (revisado por Bartel 2004, Cell 116-281). En células de mamífero, los 8 primeros nucleótidos del miARN pueden ser importantes (Doench y Sharp 2004 GenesDev 2004-504). Sin embargo, otras partes del microARN también pueden participar en la unión del ARNm. Además, un suficiente emparejamiento de bases en el extremo 3' puede compensar el insuficientemente emparejamiento en el extremo 5' (Brennecke *et al.*, 2005 PLoS 3-e85).

Los estudios en ordenador, que analizan la unión del miARN en genomas completos han sugerido una función

específica para las bases 2-7 en el extremo 5' del miARN en la unión a la diana, pero también se reconoció la función del primer nucleótido, que habitualmente resulta ser "A" (Lewis *et al.* 2005 Cell 120-15). Asimismo, los nucleótidos 1-7 o 2-8 se usaron para identificar y validar dianas por parte de Krek *et al.* (2005, Nat Genet 37-495).

- 5 Los sitios diana en el ARNm pueden estar en la 5' UTR, la 3' UTR o en la región codificante. De forma interesante, múltiples miARN pueden regular el mismo ARNm diana reconociendo el mismo o múltiples sitios. La presencia de múltiples sitios de unión de miARN en la mayoría de dianas identificadas genéticamente puede indicar que la acción cooperativa de múltiples RISC proporciona la inhibición traduccional más eficaz.
- 10 Los miARN pueden dirigir el RISC a regular por disminución la expresión génica mediante cualquiera de dos mecanismos: escisión de ARNm o represión traduccional. El miARN puede escindir específicamente el ARNm si el ARNm tiene un determinado grado de complementariedad con el miARN. Cuando un miARN guía la escisión, el corte puede ser entre los nucleótidos que emparejan los restos 10 y 11 del miARN. Como alternativa, el miARN puede reprimir la traducción si el miARN no tiene el grado necesario de complementariedad con el miARN. La represión traduccional puede ser más predominante en animales, ya que los animales pueden tener un menor grado de complementariedad entre el miARN y el sitio de unión.

20 Debe apreciarse que puede haber variabilidad en los extremos 5' y 3' de cualquier par de miARN y miARN*. Esta variabilidad se puede deber a variabilidad en el procesamiento enzimático de Drosha y Dicer con respecto al sitio de escisión. La variabilidad en los extremos 5' y 3' de miARN y miARN* también se puede deber a emparejamientos incorrectos en las estructuras de tallo del pri-miARN y el pre-miARN. Los emparejamientos incorrectos de las hebras del tallo pueden dar lugar a una población de diferentes estructuras de horquilla. La variabilidad en las estructuras del tallo también puede dar lugar a variabilidad en los productos de escisión por Drosha y Dicer.

25 **Ácidos nucleicos**

En este documento se proporcionan ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos comprenden la secuencia de las SEQ ID NO: 1-196 o variantes de las mismas. La variante puede ser un complemento de la secuencia de nucleótidos mencionada. La variante también puede ser una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos mencionada o el complemento de la misma. La variante también puede ser una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos mencionada, complementos de la misma, o secuencias de nucleótidos sustancialmente idénticas a la misma.

35 El ácido nucleico puede tener una longitud de 10 a 250 nucleótidos. El ácido nucleico puede tener una longitud de al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 o 250 nucleótidos. El ácido nucleico puede sintetizarse o expresarse en una célula (*in vitro* o *in vivo*) usando un gen sintético descrito en este documento. El ácido nucleico puede sintetizarse como una molécula monocatenaria e hibridarse con un ácido nucleico sustancialmente complementario para formar un dúplex. El ácido nucleico puede introducirse en una célula, tejido u órgano en una forma mono- o bicatenaria o puede expresarse mediante un gen sintético usando métodos bien conocidos para los expertos en la materia, incluyendo como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6 506 559.

Tabla 1: Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención

SEQ ID de horquilla	SEQ ID NO: de miR	Nombre de miR
32	13	hsa-miR-423-5p
19	1	hsa-miR-320a
33	14	hsa-miR-22
34	15	hsa-miR-92b
20	2	hsa-miR-17*
21	3	hsa-miR-532-3p
35, 36	16	hsa-miR-92a
22	4	hsa-miR-30a
23	5	hsa-miR-21
24, 25	6	hsa-miR-101
26	7	hsa-miR-363
27	8	hsa-miR-346
28	9	hsa-miR-20b
29	10	hsa-miR-25
37	17	hsa-miR-486-3p
30	11	hsa-miR-185
31	12	hsa-miR-451
38, 39	18	hsa-miR-19b
44, 45	40	hsa-miR-26a
46	41	hsa-miR-33a
47	42	hsa-miR-199b-5p

48	43	hsa-miR-27b
119	94	hsa-miR-29c
143	116	MID-00630
120	95	hsa-miR-30d
121	96	hsa-miR-140-3p
122	97	hsa-let-7b
123	98	hsa-miR-331-3p
124	99	hsa-miR-744
146	117	MID-24705
125	100	hsa-miR-28-5p
126	101	hsa-miR-574-3p
127	102	hsa-miR-223
128	103	hsa-miR-142-3p
129	104	hsa-miR-27a
130	105	hsa-miR-191
131	106	hsa-miR-335
132,133	107	hsa-miR-24
134	108	hsa-miR-151-5p
135	109	hsa-miR-126
144,145	118	MID-00108
136	110	hsa-miR-125a-5p
137,138	111	hsa-let-7f
139	112	hsa-miR-23a
140	113	hsa-miR-30e*
141	114	hsa-miR-326
142	115	hsa-miR-99b

Complejos de ácido nucleico

- 5 El ácido nucleico puede comprender además uno o más de los siguientes: un péptido, una proteína, un híbrido de ARN-ADN, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un fragmento Fab y un aptámero.

Pri-miARN

- 10 El ácido nucleico puede comprender una secuencia de un pri-miARN o una variante del mismo. La secuencia de pri-miARN puede comprender de 45-30 000, 50-25 000, 100-20 000, 1000-1500 u 80-100 nucleótidos. La secuencia del pri-miARN puede comprender un pre-miARN, miARN y miARN*, como se expone en este documento, y variantes de los mismos. La secuencia del pri-miARN puede comprender la secuencia de las SEQ ID NO: 1-48, 94-146; o variantes de las mismas.

- 15 El pri-miARN puede formar una estructura de horquilla. La horquilla puede comprender una primera y una segunda secuencia de ácido nucleico que son sustancialmente complementarias. La primera y segunda secuencia de ácido nucleico pueden ser de 37-50 nucleótidos. La primera y segunda secuencia de ácido nucleico pueden estar separadas por una tercera secuencia de 8-12 nucleótidos. La estructura de horquilla puede tener una energía libre de menos de -25 kcal/mol, calculada mediante el algoritmo de Vienna, con parámetros por defecto como se describe en Hofacker *et al.*, Monatshefte f Chemie 125: 167-188 (1994). La horquilla puede comprender un bucle terminal de 4-20, 8-12 o 20 10 nucleótidos. El pri-miARN puede comprender al menos un 19 % de nucleótidos adenosina, al menos un 16 % de nucleótidos citosina, al menos un 23 % de nucleótidos timina y al menos un 19 % de nucleótidos guanina.

Pre-miARN

- 25 El ácido nucleico también puede comprender una secuencia de un pre-miARN o una variante de la misma. La secuencia de pre-miARN puede comprender de 45-90, 60-80 o 60-70 nucleótidos. La secuencia del pre-miARN puede comprender un miARN y un miARN* como se expone en este documento. La secuencia del pre-miARN también puede ser la de un pri-miARN excluyendo 0-160 nucleótidos de los extremos 5' y 3' del pri-miARN. La secuencia del pre- 30 miARN puede comprender la secuencia de las SEQ ID NO: 1-48, 94-146; o variantes de las mismas.

miARN

El ácido nucleico también puede comprender una secuencia de un miARN (incluyendo miARN*) o una variante de la misma. La secuencia de miARN puede comprender de 13-33, 18-24 o 21-23 nucleótidos. El miARN también puede comprender un total de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos. La secuencia del miARN puede ser los primeros 13-33 nucleótidos del pre-miARN. La secuencia del miARN también puede ser los últimos 13-33 nucleótidos del pre-miARN. La secuencia del miARN puede comprender la secuencia de las SEQ ID NO: 1-18, 40-43, 94-115; o variantes de las mismas.

Anti-miARN

El ácido nucleico también puede comprender una secuencia de un anti-miARN que puede bloquear la actividad de un miARN o miARN*, tal como mediante la unión al pri-miARN, pre-miARN, miARN o miARN* (por ejemplo, antisentido o silenciamiento de ARN), o mediante la unión al sitio de unión diana. El anti-miARN puede comprender un total de 5-100 o 10-60 nucleótidos. El anti-miARN también puede comprender un total de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos. La secuencia del anti-miARN puede comprender (a) al menos 5 nucleótidos que son sustancialmente idénticos o complementarios al extremo 5' de un miARN y al menos 5-12 nucleótidos que son sustancialmente complementarios a las regiones flanqueantes del sitio diana desde el extremo 5' del miARN, o (b) al menos 5-12 nucleótidos que son sustancialmente idénticos o complementarios al extremo 3' de un miARN y al menos 5 nucleótidos que son sustancialmente complementarios a la región flanqueante del sitio diana desde el extremo 3' del miARN. La secuencia del anti-miARN puede comprender el complemento de las SEQ ID NO: 1-48, 94-146; o variantes de las mismas.

Sitio de unión de diana

El ácido nucleico también puede comprender una secuencia de un sitio de unión de microARN diana o una variante de los mismos. La secuencia del sitio diana puede comprender un total de 5-100 o 10-60 nucleótidos. La secuencia del sitio diana también puede comprender un total de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 o 63 nucleótidos. La secuencia del sitio diana puede comprender al menos 5 nucleótidos de la secuencia de las SEQ ID NO: 1-18, 40-43, 94-115.

Sondas

Se proporciona una sonda en este documento. Una sonda puede comprender un ácido nucleico. La sonda puede tener una longitud de 8 a 500, de 10 a 100 o de 20 a 60 nucleótidos. La sonda también puede tener una longitud de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 o 300 nucleótidos. La sonda puede comprender un ácido nucleico de 18-25 nucleótidos.

Una sonda puede tener capacidad de unión a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria mediante uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente mediante emparejamiento de bases complementarias, habitualmente mediante formación de enlaces de hidrógeno. Las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda, dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Una sonda puede ser monocatenaria o parcialmente monocatenaria y parcialmente bicatenaria. El tipo de hebra de la sonda está dictaminado por la estructura, composición y propiedades de la secuencia diana. Las sondas pueden marcarse directamente o marcarse indirectamente.

Sonda de ensayo

La sonda puede ser una sonda de ensayo. La sonda de ensayo puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a un miARN, un miARN*, un pre-miARN o un pri-miARN. La secuencia de la sonda de ensayo puede seleccionarse de las SEQ ID NO: 67-84, 90-93, 172-196; o variantes de las mismas.

Secuencias conectoras

La sonda puede comprender además un conector. El conector puede ser de 10-60 nucleótidos de longitud.

El conector puede ser de 20-27 nucleótidos de longitud. El conector puede ser de longitud suficiente para permitir que la sonda sea de una longitud total de 45-60 nucleótidos. El conector puede no tener capacidad para formar una estructura secundaria estable, o puede no tener capacidad de plegarse sobre sí mismo, o puede no tener capacidad de plegarse sobre una parte no conectora de un ácido nucleico contenido en la sonda. La secuencia del conector no aparece en el genoma del animal del que se obtiene el ácido nucleico no conector de la sonda.

Transcripción inversa

Pueden generarse secuencias diana de un ADNc por transcripción inversa de un ADN diana. Los métodos para generar ADNc pueden ser la transcripción inversa de un ARN poliadenilado o, como alternativa, ARN con una secuencia adaptadora ligada.

5

Transcripción inversa usando secuencia adaptadora ligada a ARN

El ARN puede ligarse a una secuencia adaptadora antes de la transcripción inversa. Una reacción de ligamiento puede realizarse mediante la ARN ligasa T4 para ligar una secuencia adaptadora en el extremo 3' del ARN. La reacción de transcripción inversa (RT) puede realizarse después usando un cebador que comprende una secuencia que es complementaria al extremo 3' de la secuencia adaptadora.

10

Transcripción inversa usando secuencia poliadenilada ligada a ARN

Puede usarse ARN poliadenilado en una reacción de transcripción inversa (RT) usando un cebador de poli(T) que comprende una secuencia adaptadora 5'. La secuencia de poli(T) puede comprender 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 timinas consecutivas.

15

RT-PCR de ARN

El transcrito inverso del ARN puede amplificarse por PCR en tiempo real, usando un cebador directo específico que comprende al menos 15 ácidos nucleicos complementarios al ácido nucleico diana y una secuencia de cola 5'; un cebador inverso que es complementario al extremo 3' de la secuencia adaptadora; y una sonda que comprende al menos 8 ácidos nucleicos complementarios al ácido nucleico diana. La sonda puede ser parcialmente complementaria al extremo 5' de la secuencia adaptadora.

20

25

PCR de ácidos nucleicos diana

En este documento se describen métodos de amplificación de ácidos nucleicos diana. La amplificación puede ser mediante un método que comprende PCR. Los primeros ciclos de la reacción de PCR pueden tener una temp. de hibridación de 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C o 60 °C. Los primeros ciclos pueden comprender 1-10 ciclos. Los ciclos restantes de la reacción de PCR pueden ser a 60 °C. Los ciclos restantes pueden comprender 2-40 ciclos. La temperatura de hibridación puede causar que la PCR sea más sensible. La PCR puede generar productos más grandes que pueden servir como moldes de PCR de mayor rigurosidad.

30

35

Cebador directo

La reacción de PCR puede comprender un cebador directo. El cebador directo puede comprender 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos idénticos al ácido nucleico diana.

40

El extremo 3' del cebador directo puede ser sensible a diferencias en la secuencia entre un ácido nucleico diana y un ácido nucleico del mismo nivel.

El cebador directo también puede comprender una cola saliente 5'. La cola 5' puede aumentar la temperatura de fusión del cebador directo. La secuencia de la cola 5' puede comprender una secuencia que no es idéntica al genoma del animal del que se aísla el ácido nucleico diana. La secuencia de la cola 5' también puede ser sintética. La cola 5' puede comprender 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos. El cebador directo puede comprender las SEQ ID NO: 49-66, 86-89, 147-171; o variantes de las mismas.

45

Cebador inverso

La reacción de PCR puede comprender un cebador inverso. El cebador inverso puede ser complementario a un ácido nucleico diana. El cebador inverso también puede comprender una secuencia complementaria a una secuencia adaptadora. La secuencia complementaria a una secuencia adaptadora puede comprender la SEQ ID NO: 85 o variantes de la misma.

50

55

Biochip

También se proporciona un biochip. El biochip puede comprender un sustrato sólido que comprende una sonda o pluralidad de sondas adherida descrita en este documento. Las sondas pueden tener la capacidad de hibridar con una secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas. Las sondas pueden adherirse en ubicaciones espacialmente definidas en el sustrato. Puede usarse más de una sonda por secuencia diana, con sondas solapantes o sondas para diferentes secciones de una secuencia diana particular. Las sondas pueden tener la capacidad de hibridar con secuencias diana asociadas con un único trastorno apreciado por los expertos en la materia. Las sondas pueden sintetizarse en primer lugar, con posterior adhesión al biochip, o pueden sintetizarse directamente sobre el biochip.

60

65

5 El sustrato sólido puede ser un material que puede modificarse para que contenga sitios individuales diferenciados apropiados para la adhesión o asociación de las sondas y es susceptible a al menos un método de detección. Los ejemplos representativos de materiales de sustrato incluyen vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plástico (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales basados en sílice que incluyen silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos y plástico. Los sustratos pueden permitir la detección óptica sin emitir fluorescencia apreciable.

10 El sustrato puede ser plano, aunque pueden usarse también otras configuraciones de sustratos. Por ejemplo, las sondas pueden colocarse sobre la superficie interior de un tubo, para el análisis de muestras que fluyen para minimizar el volumen de la muestra. Asimismo, el sustrato puede ser flexible, tal como espuma flexible, incluyendo espumas de celda cerrada hechas de plásticos particulares.

15 El sustrato del biochip y la sonda pueden derivatizarse con grupos funcionales químicos para la posterior adhesión de los dos. Por ejemplo, el biochip puede derivatizarse con un grupo funcional químico incluyendo, aunque sin limitación, grupos amino, grupos carboxilo, grupos oxo o grupos tiol. Usando estos grupos funcionales, las sondas pueden adherirse usando grupos funcionales en las sondas directa o indirectamente usando un conector.

20 Las sondas pueden adherirse al soporte sólido mediante el extremo 5', el extremo 3' o mediante un nucleótido interno.

25 La sonda también puede adherirse al soporte sólido de forma no covalente. Por ejemplo, pueden generarse oligonucleótidos biotinilados, que pueden unirse a superficies recubiertas covalentemente con estreptavidina, provocando la adhesión. Como alternativa, las sondas pueden sintetizarse sobre la superficie usando técnicas tales como fotopolimerización y fotolitografía.

Diagnóstico

30 También se proporciona un método de diagnóstico. El método comprende detectar un nivel de expresión diferencial de ácidos nucleicos asociados a cardiopatía en una muestra biológica. La muestra puede obtenerse de un paciente. El diagnóstico de la cardiopatía, y su tipo histológico, en un paciente puede permitir el pronóstico y selección de la estrategia terapéutica.

Kits

35 También se proporciona un kit y puede comprender un ácido nucleico descrito en este documento junto con cualquiera o todos los siguientes: reactivos de ensayo, tampones, sondas y/o cebadores, y solución salina estéril u otra base de emulsión o suspensión farmacéuticamente aceptable. Además, los kits pueden incluir materiales instructivos que contienen directrices (por ejemplo, protocolos) para la práctica de los métodos descritos en este documento.

40 Por ejemplo, el kit puede usarse para la amplificación, detección, identificación o cuantificación de un ácido nucleico diana. El kit puede comprender un cebador de poli(T), un cebador directo, un cebador inverso y una sonda.

45 Cualquiera de las composiciones descritas en este documento puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, se incluyen en un kit reactivos para el aislamiento de miARN, marcaje de miARN y/o evaluación de una población de miARN usando una matriz. El kit puede incluir además reactivos para crear o sintetizar sondas de miARN. Los kits, por tanto, comprenderán, en recipientes adecuados, una enzima para marcar el miARN incorporando nucleótidos marcados o nucleótidos no marcados que se marcan posteriormente. También puede incluir uno o más tampones, tal como tampón de reacción, tampón de marcaje, tampón de lavado o un tampón de hibridación, compuestos para preparar las sondas de miARN, componentes para la hibridación *in situ* y componentes para aislar miARN. Otros kits de la invención pueden incluir componentes para generar una matriz de ácidos nucleicos que comprende miARN y, por tanto, pueden incluir, por ejemplo, un soporte sólido.

55 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención. No deben interpretarse de ninguna manera, sin embargo, como limitantes del amplio alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

60 Métodos

Cohorte de pacientes y de control

Se reclutaron treinta pacientes con HF sistólica, de clase C crónica estable en el la clínica de HF en Lin Medical Center, Haifa Israel. Además, se reclutó otro grupo de control que consistía en 30 voluntarios que eran de edad, género y etnia coincidentes con el grupo de HF. El estudio se aprobó por el Comité de Revisión Institucional (comité de Helsinki) del Lady Davis Carmel Medical Center, y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio y el inicio de cualquier procedimiento relacionado con el estudio. Los criterios de inclusión para el grupo de HF fueron: pacientes de HF sistólica crónica, tratados durante al menos 3 meses de acuerdo con las directrices ACC/AHA, fase C, clínicamente estable a juicio del cardiólogo especializado en HF a cargo en el día del reclutamiento. Los criterios de inclusión para el grupo de control fueron: cualquier enfermedad coronaria, valvular o de miocardio desconocida o sin tratar. Las comorbilidades para arteriopatía coronaria, tales como diabetes mellitus, hipertensión, hiperlipidemia y tabaquismo no impiden el reclutamiento. Los criterios de exclusión para todos los participantes fueron: embarazo, diálisis, neoplasias conocidas o tratadas. Todos los datos clínicamente pertinentes se recogieron en el grupo de HF: pruebas clínicas, ecocardiográficas, electrocardiográficas, analíticas iniciales, así como los datos demográficos pertinentes en el grupo de control.

Las características del grupo de HF y la demográfica de los grupos de HF y de control se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Características de los grupos de HF y de control

Valor-P	Grupo de control (n=30)	Grupo de HF (n=30)	Variable
0,21	21 (70 %)	26 (87 %)	Género (masculino)
0,57	63 ± 12,2	64,5 ± 9,3	Edad (años)*
0,34	5 (17 %)	4(13 %)	Fumador
0,09	27,5 ± 5,3	29,9 ± 5,6	Índice de masa corporal
0,003	2 (7 %)	17 (57 %)	Diabetes <i>Mellitus</i>
0,006	0	7 (23 %)	Insuficiencia renal crónica (creatinina basal >1,5 mg/dl)
<0,0001	9 (30 %)	28 (93 %)	Bloqueantes del receptor de angiotensina/inhibidores de la enzima convertora de angiotensina
<0,0001	6 (20 %)	27 (90 %)	Beta-bloqueantes
0,001	0	10 (33 %)	Aldospirona
0,03	16(53 %)	24 (80 %)	Estatinas
	N/A	444,5 ± 835,0	BNP (pg/ml)*
	N/A	22 (73 %)	Etiología isquémica
	N/A	2,4 ± 0,4	Grado NYHA (1-4)
	N/A	16 (53 %)	Desfibrilador cardioversor implantable/tratamiento de resincronización cardíaca
0,79	Arábicos 3 (10 %) Askenazíes 17 (56 %) Sefardíes 8 (27 %) mezclados Judíos israelíes 2 (7 %)	Arábicos 3 (10 %) Askenazíes 15 (50 %) Sefardíes 10 (33 %) mezclados Judíos israelíes 2 (7 %)	Etnia

* Medias ± DT

Según se elaboran; los dos grupos (HF y control) fueron similares respecto a su edad, género, etnia, índice de masa corporal y hábitos de tabaquismo). Los cambios significativos predichos y triviales, que reflejan la naturaleza del grupo de HF frente al de control estaban en los regímenes médicos, los dispositivos antiarrítmicos y la prevalencia de las comorbilidades; incluyendo arteriopatía coronaria, diabetes *mellitus* e insuficiencia renal crónica.

Aislamiento y almacenamiento de suero

Se recogieron 8 ml de sangre de cada individuo directamente en tubos de recogida de suero (Greiner Bio-one, tubos de suero VACUETTE® 455071). Se permitió que la sangre completa reposara durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente (TA) antes de centrifugarse a 1800 g durante 10 minutos a TA. El suero resultante se dividió en alícuotas en tubos Eppendorf y se almacenó a -80 °C. Se determinaron los niveles de péptido natriurético cerebral (BNP) para los niveles de BNP en suero simultáneos (Triage MetrPro; BIOSITE, San Diego, CA).

Extracción de ARN

Se incubó suero (100 µl) durante una noche a 57 °C con 300 µl de solución de extracción de proteinasa K precalentada como se detalla en la tabla 3:

Tabla 3: Solución de extracción de proteinasa K

Final en 400 μ l (suero + tampón)	Final	Solución madre	Componente
0,0885 M	0,118 M	5 M	NaCl
9 mM	12 mM	1 M	Tris HCl pH 8
32,25 mM	47 mM	1 M	DTT
9 mM	12 mM	0,5 M	EDTA pH 8
1,8 % (62,1 mM)	2,4 % (82,8 mM)	20 % (690 mM)	SDS
2 mg/ml	2,66 mg/ml	20 mg/ml	Proteinasa K ABI (20 mg/ml)
			DDW

5 Seguimiento de la extracción con fenol:cloroformo, se añadió acrilamida lineal (8 μ l). El ARN se precipitó con ETOH a -20 °C y se resuspendió con DDW (43 μ l). A continuación, se realizó tratamiento con DNasa (Ambion) para eliminar los fragmentos de ADN residuales. Finalmente, después de una segunda extracción ácida con fenol:cloroformo, el sedimento se resuspendió en DDW.

Separación del exosoma

10 La separación del exosoma del suero se realizó usando el kit Exoquick (ExoQuick™ solución de precipitación de exosoma n.º de Cat. EXOQ20A-1, SBI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

qRT-PCR

15 El ARN se sometió a una reacción de poliadenilación como se describe previamente (Shi, R. y Chiang, V.L. 2005, Biotechniques. 39(4):519-25). En resumen, el ARN se incubó en presencia de poli (A) polimerasa (PAP; NEB-M0276L), MnC12, y ATP durante 1 h a 37 °C. Después, usando un cebador oligo-dT que alberga una secuencia consenso (complementaria al cebador inverso) se realizó transcripción inversa sobre el ARN total usando SuperScript II RT (Invitrogen). A continuación, el ADNc se amplificó por PCR en tiempo real; esta reacción contenía un cebador directo
20 específico de micro-ARN, una sonda TaqMan complementaria al extremo 3' de la secuencia de micro-ARN específica, así como a parte de la secuencia adaptadora de poli-A y un cebador inverso universal complementario a la secuencia 3' consenso de la cola de oligo-dT.

25 Los controles negativos estudiados junto con las muestras de ARN sirven para detectar contaminaciones potenciales y/o amplificaciones no específicas. El número de ciclos al que la fluorescencia pasa el umbral (umbral de ciclo-Ct) se midió para cada miARN en cada muestra.

Análisis de miARN en suero

30 Se midieron 380 miARN que se detectaron en experimentos previos realizados por los autores de la presente invención en tejido cardíaco o suero de individuos sanos, en 4 combinaciones creadas a partir de sueros de 6 pacientes con HF y 6 individuos sanos y en un control negativo. De estos miARN, 186 se detectaron de forma fiable en al menos una de las combinaciones, con una diferencia de al menos 3 CT en comparación con el control negativo. Estos 186 miARN se midieron en los sueros de los 60 participantes y 2 controles negativos usando RT-PCR. Los 7 miR para los que el
35 promedio de Ct en las muestras de suero era de menos de 3 Ct inferior al promedio de Ct en los controles negativos se omitieron del análisis y la normalización.

Análisis de datos y estadística

40 Cada muestra se normalizó restando el promedio de Ct de todos de los miR de la muestra del Ct de cada miR, y añadiendo de nuevo una constante de gradación (el promedio de Ct sobre el conjunto de muestra completo). Las señales normalizadas se compararon entre los grupos para encontrar los miR que pueden usarse para diferenciar entre los grupos. La significación de las diferencias se evaluó por un ensayo de la t para muestras no emparejadas
45 bilateral. Se usó el método de tasa de descubrimiento de falsos de Benjamini-Hochberg (FDR) (Benjamini *et al.*, 1995, J. Roy. Statist. Soc. Ser. B 57 n.º 1, 289-300) para controlar el ensayo de múltiples hipótesis, usando un FDR de 0,1. El cambio factorial se calculó como la diferencia absoluta en los valores de promedio del Ct normalizado en los dos grupos.

50 Para cada miARN, así como para la puntuación de miARN, se caracterizó la capacidad de discriminar entre los grupos de HF y de control por la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) y se calculó el área bajo la curva ROC (AUC).

Para las gráficas de caja y el cálculo de la puntuación, se usaron señales normalizadas invertidas de modo que valores altos representan alta expresión. La señal normalizada invertida para cada miR se calcula restando el Ct normalizado de 50.

55 La validación cruzada dejando uno fuera con un modelo de regresión logística se usó para simular el rendimiento de

- un algoritmo de clasificación en muestras no observadas. El modelo de regresión logística se volvió a capacitar repetidamente dejando una muestra en cada ronda, y ensayando cada muestra en un clasificador que se capacitó sin la misma. Asociaciones entre la puntuación y las variables clínicas/de pronóstico: Para variables dicotómicas, se usó un ensayo de la t de muestras no emparejadas bilateral para comparar las puntuaciones de los pacientes en los dos grupos. Para variables continuas, se usó un ensayo de la t para muestras no emparejadas bilateral para comparar la puntuación de muestras cuyos valores estaban en la mitad superior de las muestras cuyos valores estaban en la mitad inferior. La correlación entre BNP y la puntuación se midió usando el coeficiente del orden de Spearman ya que la relación no es lineal.
- 5
- 10 Se usaron ensayos de ji al cuadrado para comparar las variables categóricas. El ensayo exacto de Fisher se usó en casos de tamaños de muestra pequeños.

Ejemplo 2

15 Los micro-ARN específicos se usan para la detección de HF en muestras de suero

- Los niveles de 186 micro-ARN se midieron en todas las muestras de suero y se normalizaron como se describe en la sección de métodos. Las señales para las 30 muestras en el grupo de insuficiencia cardiaca se compararon con las señales de las 30 muestras en el grupo de control. Un total de 47 miR pasó el umbral de FDR de 0,1 (valor p de corte 0,027). De estos, los niveles de promedio de 18 miR en los sueros del grupo de insuficiencia cardiaca estaban por encima de 1,2 veces mayores que los detectados en sueros de controles.
- 20

Tabla 4A: miR regulados por aumento en el grupo de insuficiencia cardiaca frente al grupo de control

Valores de promedio**	AUC*	Cambio factorial	Valor-p	Nombre del miR	
16,922	17,485	0,88	1,48 (+)	1,80E-08	hsa-miR-423-5p
18,883	19,156	0,86	1,21 (+)	1,50E-05	hsa-miR-320a
18,655	19,119	0,8	1,38 (+)	1,30E-04	hsa-miR-22
17,128	17,467	0,76	1,26 (+)	4,50E-04	hsa-miR-92b
14,435	14,823	0,76	1,31 (+)	7,50E-04	hsa-miR-17*
13,857	14,308	0,73	1,37 (+)	8,20E-04	hsa-miR-532-3p
21,885	22,34	0,74	1,37 (+)	1,90E-03	hsa-miR-92a
17,161	17,677	0,73	1,43 (+)	2,90E-03	hsa-miR-30a
20,411	20,735	0,72	1,25 (+)	4,20E-03	hsa-miR-21
18,081	18,287	0,72	1,15 (+)	5,20E-03	hsa-miR-29c
16,713	17,145	0,71	1,35 (+)	7,20E-03	hsa-miR-101
16,855	17,419	0,71	1,48 (+)	7,80E-03	hsa-miR-363
13,739	13,988	0,68	1,19 (+)	8,30E-03	MID-00630 (0,6)
12,415	12,866	0,69	1,37 (+)	8,40E-03	hsa-miR-346 (0,7)
16,833	17,362	0,72	1,44 (+)	8,50E-03	hsa-miR-20b
19,507	19,992	0,7	1,40 (+)	1,20E-02	hsa-miR-25
18,811	19	0,69	1,14 (+)	1,30E-02	hsa-miR-30d
13,022	13,433	0,69	1,33 (+)	1,30E-02	hsa-miR-486-3p
18,125	18,479	0,68	1,28 (+)	1,50E-02	hsa-miR-185
16,978	17,201	0,7	1,17 (+)	1,60E-02	hsa-miR-140-3p
25,144	25,535	0,68	1,31 (+)	1,60E-02	hsa-miR-451
19,236	19,448	0,66	1,16 (+)	2,10E-02	hsa-let-7b
21,402	21,769	0,66	1,29 (+)	2,40E-02	hsa-miR-19b

25 Tabla 4B: miR regulados por disminución en el grupo de insuficiencia cardiaca frente al grupo de control

Valores de promedio**	AUC*	Cambio factorial	Valor-p	Nombre del miR	
17,501	17,211	0,76	1,22 (-)	7,60E-05	hsa-miR-26a
14,884	14,427	0,79	1,37 (-)	1,40E-04	hsa-miR-199b-5p
17,318	17,044	0,74	1,21 (-)	3,80E-04	hsa-miR-33a
20,785	20,574	0,72	1,16 (-)	1,80E-03	hsa-miR-27b
15,374	15,024	0,73	1,27 (-)	1,90E-03	hsa-miR-331-3p
14,694	14,341	0,71	1,28 (-)	2,60E-03	hsa-miR-744
21,356	21,023	0,72	1,26 (-)	2,70E-03	MID-24705 (0,7)
17,272	16,979	0,7	1,23 (-)	2,90E-03	hsa-miR-28-5p
14,59	14,221	0,73	1,29 (-)	3,70E-03	hsa-miR-574-3p
22,219	21,984	0,7	1,18 (-)	4,50E-03	hsa-miR-223
19,917	19,618	0,7	1,23 (-)	4,60E-03	hsa-miR-142-3p
21,656	21,448	0,7	1,15 (-)	4,60E-03	hsa-miR-27a
16,922	16,752	0,69	1,13 (-)	5,20E-03	hsa-miR-191
14,8	14,478	0,71	1,25 (-)	6,00E-03	hsa-miR-335

19,551	19,32	0,7	1,17 (-)	7,00E-03	hsa-miR-24
16,297	15,872	0,68	1,34 (-)	9,00E-03	hsa-miR-151-5p
20,092	19,82	0,68	1,21 (-)	1,00E-02	hsa-miR-126
11,868	10,733	0,66	2,20 (-)	1,10E-02	MID-00108 (0,7)
15,497	15,359	0,66	1,10 (-)	1,20E-02	hsa-miR-125a-5p
16,407	16,077	0,69	1,26 (-)	1,50E-02	hsa-let-7f
22,104	21,918	0,68	1,14 (-)	1,80E-02	hsa-miR-23a
14,255	13,995	0,7	1,20 (-)	1,90E-02	hsa-miR-30e*
14,185	13,935	0,66	1,19 (-)	2,00E-02	hsa-miR-326
15,363	14,617	0,7	1,68 (-)	2,20E-02	hsa-miR-99b

* AUC indica el área bajo la curva ROC para la discriminación entre el grupo de HF y de control.

** Los valores de promedio también se dan como señales invertidas normalizadas.

5 **Tabla 5:** Secuencias de cebadores y sondas usados para la detección de miR diferenciales

MGB SEQ ID NO:	Secuencia de MGB	Directo SEQ ID NO:	Directo	Nombre del miR
67	CCGTTTTTTTTTTTCG CCCTCT	49	CAGTCATTTGGGAAAA GCTGGGTTGAGA	hsa-miR-320a
68	CCGTTTTTTTTTTTCA GTTATC	50	CAGTCATTTGGCTACAG TACTGTGATAA	hsa-miR-101
69	ATCCGTTTTTTTTTTT CTACAAGT	51	CAGTCATTTGGCACTGC AGTGAAGGCAC	hsa-miR-17*
70	CGTTTTTTTTTTTTCAG GAACT	52	CAGTCATTTGGCTGGAG AGAAAGGCAGT	hsa-miR-185
71	CGTTTTTTTTTTTTCAG TTTTG	53	CAGTCATTTGGCTGTGC AAATCCATGCA	hsa-miR-19b
72	CCGTTTTTTTTTTTCT ACCTGC	54	CAGTCATTTGGCCAAA GTGCTCATAGTG	hsa-miR-20b
73	CCGTTTTTTTTTTTCT TCCAGT	55	CAGTCATTTGGGTGTAA ACATCCTCGAC	hsa-miR-30a
74	CCGTTTTTTTTTTTAC AGATGG	56	CAGTCATTTGGCAATTG CACGGTATCCA	hsa-miR-363
75	TCCGTTTTTTTTTTTA CTCAGTA	57	CAGTCATTTGGGAAAC CGTTACCATTAC	hsa-miR-451
76	CGTTTTTTTTTTTACA GGCCG	58	CAGTCATTTGGCTATTG CACTTGTCCCG	hsa-miR-92a
77	CGTTTTTTTTTTTGGA GGCCG	59	CAGTCATTTGGGTATTG CACTCGTCCCG	hsa-miR-92b
78	CCGTTTTTTTTTTTCA ACATCA	60	CAGTCATTTGGCTAGCT TATCAGACTGA	hsa-miR-21
79	CCGTTTTTTTTTTTAC AGTTCT	61	CAGTCATTTGGCAAGCT GCCAGTTGAAG	hsa-miR-22
80	CCGTTTTTTTTTTTCA GACCGA	62	CAGTCATTTGGCCATTG CACTTGCTCTCG	hsa-miR-25
81	CCGTTTTTTTTTTTAG AGGCAG	63	CAGTCATTTGGCTGTCT GCCCCATGCC	hsa-miR-346
82	CCGTTTTTTTTTTTAA AGTCTC	64	CAGTCATTTGGCTGAGG GGCAGAGAGCG	hsa-miR- 423-5p
83	AAAACCGATAGTGAG TCG	65	CGGGGCAGCTCAGTAC AGGAT	hsa-miR-486-3p
84	AAAACCGATAGTGAG TCG	66	CCTCCACACCCAAGG CTTGCA	hsa-miR-532-3p
90	CCGTTTTTTTTTTTAG CCTATC	86	CAGTCATTTGGCTTCAA GTAATCCAGGA	hsa-miR-26a
91	CGTTTTTTTTTTTGCA GAACT	87	CAGTCATTTGGGTTTAC AGTGGCTAAGT	hsa-miR-27b
92	CCGTTTTTTTTTTTGA ACAGAT	88	CAGTCATTTGGCCCCAG TGTTTAGACTA	hsa-miR-199b-5p
93	CCGTTTTTTTTTTTGC AATGCA	89	CAGTCATTTGGCGTGCA TTGTAGTTGCA	hsa-miR-33a
172	CCGTTTTTTTTTTTAA	147	CAGTCATTTGGCTGAGG	hsa-let-7b

	CCACAC		TAGTAGGTTGT	
173	CCGTTTTTTTTTTTTAA CTATAC	148	CAGTCATTTGGGTGAG GTAGTAGATTGT	hsa-let-7f
174	CCGTTTTTTTTTTTTCA CAGGTT	149	CAGTCATTTGGCTCCCT GAGACCCTTTA	hsa-miR-125a-5p
175	CCGTTTTTTTTTTTTCG CATTAT	150	CAGTCATTTGGGTCGTA CCGTGAGTAAT	hsa-miR-126
176	CCGTTTTTTTTTTTTCC GTGGTT	151	CAGTCATTTGGCTACCA CAGGGTAGAAC	hsa-miR-140-3p
177	CCGTTTTTTTTTTTTCC ATAAAG	152	CAGTCATTTGGGTGTAG TGTTTCTACT	hsa-miR-142-3p
178	CCGTTTTTTTTTTTTAC TAGACT	153	CAGTCATTTGGGTCGAG GAGCTCACAGT	hsa-miR-151-5p
179	CGTTTTTTTTTTTTTCA CTGCT	154	CAGTCATTTGGGCAAC GGAATCCAAAA	hsa-miR-191
180	CCGTTTTTTTTTTTTGG GGTATT	155	CAGTCATTTGGCTGTCA GTTTGTCAAAT	hsa-miR-223
181	CCGTTTTTTTTTTTTGG AAATCC	156	CAGTCATTTGGCATCAC ATTGCCAGGGA	hsa-miR-23a
182	CCGTTTTTTTTTTTTCT GTTTCT	157	CAGTCATTTGGCTGGCT CAGTTCAGCAG	hsa-miR-24
183	CCGTTTTTTTTTTTTGC GGAACT	158	CAGTCATTTGGCTTAC AGTGGCTAAGT	hsa-miR-27a
184	CCGTTTTTTTTTTTTCT CAATAG	159	CAGTCATTTGGCAAGG AGCTCACAGTCT	hsa-miR-28-5p
185	CCGTTTTTTTTTTTTAA CCGATT	160	CAGTCATTTGGCTAGCA CCATTTGAAAT	hsa-miR-29c
186	CCGTTTTTTTTTTTTCT TCCAGT	161	CAGTCATTTGGGTGTAA ACATCCCGAC	hsa-miR-30d
187	CCGTTTTTTTTTTTTGC TGAAA	162	CAGTCATTTGGCCTTTC AGTCGGATGTT	hsa-miR-30e*
188	CCGTTTTTTTTTTTTAC TGGAGG	163	CAGTCATTTGGCCCTCT GGGCCCTTCT	hsa-miR-326
189	CCGTTTTTTTTTTTTCT AGGATA	164	CAGTCATTTGGCGCCCC TGGGCCTATCC	hsa-miR-331-3p
190	CCGTTTTTTTTTTTTAC ATTTTT	165	CAGTCATTTGGCTCAAG AGCAATAACGA	hsa-miR-335
191	CCGTTTTTTTTTTTTGT GGGTGT	166	CAGTCATTTGGCCACGC TCATGCACACA	hsa-miR-574-3p
192	CCGTTTTTTTTTTTTGC TGTTAG	167	CAGTCATTTGGCTGCGG GGCTAGGGCTA	hsa-miR-744
193	CCGTTTTTTTTTTTTCG CAAGGT	168	CAGTCATTTGGCCACCC GTAGAACCGAC	hsa-miR-99b
194	CCGTTTTTTTTTTTTGT CAGCAG	169	CAGTCATTTGGCTCACA ATGCTGACACT	MID-00108
195	CCGTTTTTTTTTTTTCA CATTCC	170	CAGTCATTTGGCTCTCC GGGGAGGCAGG	MID-00630
196	AAAACCGATAGTGAG TCG	171	GCCTCCCACTGCTTAC TTGACTA	MID-24705
		85	Complemento inverso	

Los estudios recientes sugieren que los micro-ARN en la circulación están protegidos del entorno rico en RNasa por complejos proteínicos o por encapsulación en vesículas tales como exosomas. Para explorar si las diferencias observadas en los niveles de miARN existen en la fracción exosómica, se midieron los niveles de miARN en sueros de 10 pacientes con HF y 10 controles procesados con el kit Exoquick que enriquece la muestra con miARN exosómicos. Las diferencias en los niveles de micro-ARN entre HF y controles en la fracción exosómica fueron similares a los observados en el suero no fraccionado. Específicamente, los cuatro miARN principales con niveles elevados en suero no fraccionado de pacientes con HF también estaban elevados en la fracción exosómica de pacientes con HF respecto a los controles. Sin embargo, no hubo aumento en la fuerza de las diferencias (datos no mostrados).

Los cuatro miARN que tenían los niveles aumentados más significativos ($p < 0,0005$) en sueros de pacientes de HF en comparación con sueros de controles eran: hsa-miR-423-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-320a, y hsa-miR-92b. Las gráficas de caja para estos miR se muestran en las figuras 1A.1D.

Se calculó una puntuación (puntuación de miR) para cada muestra como la señal invertida normalizada a la media de estos 4 miR y ajustado restando una constante (la puntuación mínima) de modo que el intervalo de puntuaciones empieza en 0. La puntuación de miR se comparó entre el grupo de HF y de control. La puntuación de miR permitió una separación significativa entre el grupo de HF y de control con un promedio de puntuación de 2,9 in el grupo de HF y de 1,3 en el grupo de control (figura 3). La capacidad de puntuación de miR de discriminar el grupo de HF del grupo de control se caracteriza por la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) con un área bajo la curva ROC (AUC) de 0,9, (figura 4). Clasificando cualquier puntuación por encima de 1,98 como paciente de HF "probable", se consigue una sensibilidad de un 90 % y una especificidad de un 90 % par identificación del paciente con HF. La validación cruzada dejando uno fuera con un clasificador de regresión logístico usando la puntuación de miARN para discriminar HF de los controles produjo resultados similares (especificidad de un 90 % y sensibilidad de un 87 %).

Ejemplo 3

15 Puntuación de los miR y asociación clínica

La puntuación de los miR se ensayó para la posible asociación con varios parámetros clínicos y pronósticos: edad, género, índice de masa corporal (BMI), etiología isquémica, fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (LVEF), clasificación funcional (NYHA) de la New York Heart Association (NYHA), dimensión diastólica final del ventrículo izquierdo (EDD), dimensión de la aurícula izquierda (LAD), niveles en suero de BNP y anchura de QRS ancho (≥ 120 ms) en el electrocardiograma. El análisis se realizó como se describe en el ejemplo 1.

No hubo asociación significativa entre la puntuación de los miR y la edad ($p=0,58$), el género ($p=0,9$), BMI ($p=0,25$), etiología isquémica ($p=0,93$), LVEF ($p=0,37$) o NYHA ($p=0,35$). Sin embargo, una alta puntuación de los miR tuvo una asociación significativa con niveles elevados de BNP en suero ($p=0,002$), QRS ancho ($p=0,009$), EDD ($p=0,03$) y LAD ($p=0,01$), (figuras 6, 7, 8, 9, respectivamente). Para el nivel de BNP en suero, se observó una fuerte correlación con la puntuación de miR ($r=0,63$; $p=0,0003$) (figura 5).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> ROSETTA GENOMICS LTD; MOR RESEARCH APPLICATIONS LTD
- <120> Métodos y composiciones para determinar insuficiencia cardiaca o un riesgo de insuficiencia cardiaca
- 35 <130> P-77549-EP
- <140> EP 12790197.3
- <141> 23-05-2012
- 40 <150> US 61/489.272
- <151> 24-05-2011
- <160> 196
- 45 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 22
- <212> ARN
- 50 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- aaaagcuggg uugagagggc ga 22
- 55 <210> 2
- <211> 22
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 60 <400> 2
- acugcaguga aggcacuugu ag 22
- <210> 3
- <211> 22
- 65 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*

	<400> 3 ccucccacac ccaagguug ca	22
5	<210> 4 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 4 uguaaacauc cucgacugga ag	22
15	<210> 5 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 5 uagcuuauca gacugauguu ga	22
25	<210> 6 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 6 uacaguacug ugauaacuga a	21
35	<210> 7 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 7 aauugcacgg uauccaucug ua	22
45	<210> 8 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 8 ugucugcccg caugccugcc ucu	23
55	<210> 9 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 9 caaagugcuc auagucagg uag	23
65	<210> 10 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10 cauugcacuu gucucggucu ga	22
	<210> 11 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 11	

ES 2 703 133 T3

	uggagagaaa ggcaguuccu ga	22	
5	<210> 12 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
10	<400> 12 aaaccguuac cauuacugag u	21	
15	<210> 13 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
20	<400> 13 ugagggcgag agagcgagac uuu	23	
25	<210> 14 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
30	<400> 14 aagcugccag uugaagaacu gu	22	
35	<210> 15 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
40	<400> 15 uauugcacuc gucccggccu cc	22	
45	<210> 16 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
50	<400> 16 uauugcacuu gucccggccu gu	22	
55	<210> 17 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
60	<400> 17 cggggcagcu caguacagga u	21	
65	<210> 18 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 18 ugugcaaauc caugcaaaac uga	23	
	<210> 19 <211> 82 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 19 gcuucgcucc ccuccgccuu cucuucccgg uucuucccgg agucgggaaa agcuggguug		60

ES 2 703 133 T3

	agagggcgaa aaaggaugag gu	82
5	<210> 20 <211> 84 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 20 gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga	60
10	aggcacuugu agcauuauagg ugac	84
15	<210> 21 <211> 91 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 21 cgacuugcuu ucucuccucc augccuugag uguaggaccg uuggcaucuu aauuaccuc	60
	ccacacccaa ggcuugcaaa aaagcgagcc u	91
20	<210> 22 <211> 71 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 22 gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca gaugggcuuu cagucggau	60
25	uuugcagcug c	71
30	<210> 23 <211> 72 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23 ugucggguag cuuauacagac ugauguugac uguugaaucu cauggcaaca ccagucgaug	60
	ggcugucuga ca	72
35	<210> 24 <211> 75 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 24 ugcccuggcu caguauacac agugcugaug cugucuauuc uaaagguaca guacugugau	60
	aacugaagga uggca	75
45	<210> 25 <211> 79 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 25	

ES 2 703 133 T3

	acuguccuuu uucgguuauc augguaccga ugcuguaauu cugaaaggua caguacugug	60
	auaacugaag aaugguggu	79
5	<210> 26 <211> 75 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 26 uguugucggg uggauccacga ugcauuuuug augaguauca uaggagaaaa auugcacggu	60
10	auccaucugu aaacc	75
	<210> 27 <211> 95 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 27 ggucucugug uugggcgucu gucugcccgc augccugccu cucuguugcu cugaaggagg	60
	caggggcugg gccugcagcu gccugggcag agcgg	95
20	<210> 28 <211> 69 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 28 aguaccaaag ugcucauagu gcagguaguu uuggcaugac ucuacuguag uaugggcacu	60
25	uccaguacu	69
	<210> 29 <211> 84 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 29 ggccaguguu gagaggcgga gacuugggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu	60
	ugucucgguc ugacagugcc ggcc	84
35	<210> 30 <211> 82 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 30 agggggcgag ggauuggaga gaaaggcagu uccugauggu cccuuccca ggggcuggcu	60
	uuccucuggu ccuuccuucc ca	82
45	<210> 31 <211> 72 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 31	

ES 2 703 133 T3

	cuugggaaug gcaaggaaac cguuaccuu acugaguua gaaugguaa ugguucuu	60
	gcuauaccca ga	72
5	<210> 32 <211> 94 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 32 auaaaggaag uuaggcugag gggcagagag cgagacuuu cuuuuucca aaagcucggu	60
	cugaggcccc ucagucuugc uuccuaacct gcgc	94
10	<210> 33 <211> 85 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 33 ggcugagccg caguaguucu ucaguggcaa gcuuuuguc cugacctagc uaaagcugcc	60
	aguugaagaa cuguugcccu cugcc	85
20	<210> 34 <211> 96 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 34 cgggccccgg gcgggcggga gggacgggac gcggugcagu guuguuuuu cccccgcaa	60
25	uauugcacuc guccccggccu cgggcccccc cggccc	96
30	<210> 35 <211> 78 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 35 cuuucacac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc ugaugguau ugcacuugc	60
	ccggccuguu gaguuugg	78
35	<210> 36 <211> 75 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 36 ucaucccugg guggggauuu guugcauuac uuguguucua uauaaaguau ugcacuugc	60
	ccggccugug gaaga	75
45	<210> 37 <211> 68 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 37	

ES 2 703 133 T3

	gcauccugua cugagcugcc ccgaggcccu ucaugcugcc cagcucgggg cagcucagua	60
	caggauac	68
5	<210> 38 <211> 87 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 38	
	cacuguucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug ugugauauuc ugcugugcaa	60
10	auccaugcaa aacugacugu gguagug	87
	<210> 39 <211> 96 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 39	
	acaungcuac uuacaauuag uuuugcaggu uugcauuuca gcguauauau guauaugugg	60
	cugugcaaa ccaugcaaaa cugauuguga uaaugu	96
20	<210> 40 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 40 uucaaguaau ccaggauagg cu	22
30	<210> 41 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 41 gugcaugua guugcauugc a	21
35	<210> 42 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 42 cccaguguuu agacuaucug uuc	23
45	<210> 43 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 43 uucacagugg cuaaguucug c	21
55	<210> 44 <211> 77 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 44	

ES 2 703 133 T3

	guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaaugggcc uauucuuggu	60
	uacuugcacg gggacgc	77
5	<210> 45 <211> 84 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 45	
	ggcuguggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu	60
10	gauuacuugu uucuggagc agcu	84
	<210> 46 <211> 69 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 46	
	cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggugguac ccaugcaaug uuuccacagu	60
	gcaucacag	69
20	<210> 47 <211> 110 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 47	
	ccagaggaca ccuccacucc gucuaccag uguuuagacu aucuguucag gacuccaaa	60
25	uuguacagua gucugcacau ugguuaggcu gggcuggguu agaccucgg	110
	<210> 48 <211> 97 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 48	
	accucucuaa caaggugcag agcuuagcug auuggugaac agugauuggu uuccgcuug	60
	uucacagugg cuaaguucug caccugaaga gaaggug	97
35	<210> 49 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
	<400> 49	
45	cagtcattg ggaaaagctg gggtgaga	28
	<210> 50 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Sintética	
5	<400> 50 cagtcatttg gctacagtac tgtgataa	28
	<210> 51 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<400> 51 cagtcatttg gcaactgcagt gaaggcac	28
	<210> 52 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 52 cagtcatttg gctggagaga aaggcagt	28
	<210> 53 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 53 cagtcatttg gctgtgcaaa tccatgca	28
	<210> 54 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
45	<400> 54 cagtcatttg gccaaagtgc tcatagtg	28
	<210> 55 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 55 cagtcatttg ggtgtaaaca tcctcgac	28
60	<210> 56 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220>	

	<223> Sintética	
5	<400> 56 cagtcatttg gcaattgcac ggtatcca	28
	<210> 57 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<400> 57 cagtcatttg ggaaaccggt accattac	28
	<210> 58 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 58 cagtcatttg gctattgcac ttgtcccg	28
	<210> 59 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 59 cagtcatttg ggtattgcac tcgtcccg	28
	<210> 60 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
45	<400> 60 cagtcatttg gctagcttat cagactga	28
	<210> 61 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 61 cagtcatttg gcaagctgcc agttgaag	28
60	<210> 62 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220>	

	<223> Sintética	
5	<400> 62 cagtcatttg gccattgcac ttgtctcg	28
	<210> 63 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<400> 63 cagtcatttg gctgtctgcc cgcattgcc	28
	<210> 64 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 64 cagtcatttg gctgaggggc agagagcg	28
	<210> 65 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 65 cggggcagct cagtacagga t	21
	<210> 66 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
45	<400> 66 cctccacac ccaaggcttg ca	22
	<210> 67 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 67 ccgtttttt ttttgcgcc tct	23
60	<210> 68 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220>	

	<223> Sintética	
5	<400> 68 ccgtttttt ttttcagtt atc	23
	<210> 69 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<400> 69 atccgttttt ttttttcta caagt	25
	<210> 70 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 70 cgttttttt ttttcaggaa ct	22
	<210> 71 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 71 cgttttttt ttttcagttt tg	22
	<210> 72 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
45	<400> 72 ccgttttttt tttttctacc tgc	23
	<210> 73 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 73 ccgttttttt tttttctcc agt	23
	<210> 74 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	
65		

	<223> Sintética	
5	<400> 74 cgtttttt ttttacaga tgg	23
	<210> 75 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<400> 75 tccgttttt tttttactc agta	24
	<210> 76 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 76 cgtttttt ttttacaggc cg	22
	<210> 77 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 77 cgtttttt tttggaggc cg	22
	<210> 78 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
45	<400> 78 ccgttttt ttttcaaca tca	23
	<210> 79 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 79 ccgttttt ttttacagt tct	23
	<210> 80 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	
65		

	<223> Sintética	
5	<400> 80 ccgtttttt ttttcagac cga	23
	<210> 81 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<400> 81 ccgtttttt ttttagagg cag	23
	<210> 82 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 82 ccgtttttt ttttaaagt ctc	23
	<210> 83 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 83 aaaaccgata gtgagtcg	18
	<210> 84 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
45	<400> 84 aaaaccgata gtgagtcg	18
	<210> 85 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 85 gcgagcacag aattaatagc ac	22
60	<210> 86 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220>	

	<223> Sintética	
5	<400> 86 cagtcatttg gctcaagta atccagga	28
	<210> 87 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<400> 87 cagtcatttg gggtcacagt ggctaagt	28
	<210> 88 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 88 cagtcatttg gcccagtg ttagacta	28
	<210> 89 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 89 cagtcatttg gcgtgcattg tagtgca	28
	<210> 90 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
45	<400> 90 ccgtttttt ttttagcct atc	23
50	<210> 91 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintética	
60	<400> 91 cgttttttt tttgcagaa ct	22
	<210> 92 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220>	

	<223> Sintética	
5	<400> 92 ccgtttttt ttttgaaca gat	23
	<210> 93 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<400> 93 ccgtttttt ttttgaat gca	23
	<210> 94 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 94 uagcaccauu ugaaucggu ua	22
25	<210> 95 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 95 uguaaacauc cccgacugga ag	22
	<210> 96 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 96 uaccacaggg uagaaccacg g	21
40	<210> 97 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 97 ugagguagua gguugugugg uu	22
50	<210> 98 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 98 gccccugggc cuaucchuaga a	21
	<210> 99 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 99 ugcggggcua gggcuaacag ca	22
65	<210> 100 <211> 22	

ES 2 703 133 T3

	<212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 100 aaggagcuca cagucuauug ag	22
10	<210> 101 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 101 cacgcucaug cacacaccca ca	22
20	<210> 102 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 102 ugucaguuug ucaaaauaccc ca	22
30	<210> 103 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 103 uguaguguuu ccuacuuuau gga	23
40	<210> 104 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 104 uucacagugg cuaaguuccg c	21
50	<210> 105 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 105 caacggaauc ccaaaagcag cug	23
60	<210> 106 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 106 ucaagagcaa uaacgaaaaa ugu	23
70	<210> 107 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
75	<400> 107 uggcucaguu cagcaggaac ag	22
80	<210> 108 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	

	<400> 108 ucgaggagcu cacagucuag u	21
5	<210> 109 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 109 ucguaccgug aguaauaug cg	22
15	<210> 110 <211> 24 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 110 ucccugagac ccuuuaaccu guga	24
25	<210> 111 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 111 ugagguagua gauuguauag uu	22
35	<210> 112 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 112 aucacauugc cagggauuuc c	21
45	<210> 113 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 113 cuucagucg gauguuuaca gc	22
55	<210> 114 <211> 20 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 114 ccucugggcc cuuccuccag	20
65	<210> 115 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 115 cacccguaga accgaccuug cg	22
	<210> 116 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 116	

ES 2 703 133 T3

	ucuccgggga ggcaggaug ug	22	
5	<210> 117 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
10	<400> 117 cucccacugc uucacuugac ua	22	
15	<210> 118 <211> 18 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
20	<400> 118 acacucaaac ugcugaca	18	
25	<210> 119 <211> 88 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 119 aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc		60
	auuugaaauc gguuaugaug uaggggga		88
30	<210> 120 <211> 70 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 120 guuguuguaa acauccccga cuggaagcug uaagacacag cuaagcuuuc agucagaugu		60
	uugcugcuac		70
35	<210> 121 <211> 100 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
40	<400> 121 ugugucucuc ucuguguccu gccagugguu uuaccuauug guagguuacg ucaugcuguu		60
	cuaccacagg guagaaccac ggacaggaua ccggggcacc		100
45	<210> 122 <211> 83 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 122 cggggugagg uaguagguug ugugguuua gggcagugau guugccccuc ggaagauaac		60
	uauacaaccu acugccuucc cug		83
50	<210> 123 <211> 94 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		

ES 2 703 133 T3

	<400> 123		
		gaguuuugguu uuguuugggu uuguucuagg uaugguccca gggaucccag aucaaaccag	60
		gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa gcuc	94
5	<210> 124 <211> 98 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 124		
		uugggcaagg ugcggggcua gggcuaacag cagucuuacu gaagguuucc uggaaccac	60
10		gcacaugcug uugccacuaa ccucaaccuu acucgguc	98
15	<210> 125 <211> 86 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 125		
		gguccuugcc cucaaggagc ucacagucua uugaguuacc uuucugacuu ucccacuaga	60
		uugugagcuc cuggagggca ggcacu	86
20	<210> 126 <211> 96 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
25	<400> 126		
		gggaccugcg ugggugcggg cgugugagug ugugugugug aguguguguc gcuccggguc	60
		cacgcucaug cacacacca cacgcccaca cucagg	96
30	<210> 127 <211> 110 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 127		
		ccuggccucc ugcagugcca cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacuccaugu	60
35		gguagagugu caguuuuguca aaauccccaa gugcggcaca ugcuuaccag	110
40	<210> 128 <211> 87 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 128		
		gacagugcag ucacccaauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguaguguu	60
		uccuacuuua uggaugagug uacugug	87
45	<210> 129 <211> 78 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		

ES 2 703 133 T3

	<400> 129		
		cugaggagca gggcuuagcu gcuugugagc aggguccaca ccaagucgug uucacagugg	60
		cuaaguuccg cccccag	78
5	<210> 130 <211> 92 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
10	<400> 130		
		cggcugggaca gcgggcaacg gaauccc aaa agcagcuguu gucuccagag cauuccagcu	60
		gcgcuuggau uucguccccc gcucuccugc cu	92
15	<210> 131 <211> 94 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 131		
		uguuuugagc gggggcaag agcaauaacg aaaaanguuu gucauaaac guuuuucuu	60
		auugcuccug accuccucuc auuugcuua uuca	94
20	<210> 132 <211> 68 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
25	<400> 132		
		cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucuuuuaca cacuggcuca guucagcag	60
		aacaggag	68
30	<210> 133 <211> 73 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 133		
		cucugccucc cgugccuacu gagcugaaac acaguugguu uguguacacu ggcucaguuc	60
35		agcaggaaca ggg	73
40	<210> 134 <211> 90 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 134		
		uuuccugccc ucgaggagcu cacagucuag uaugucucuu cccuacuag acugaagcuc	60
		cuugaggaca gggauugguca uacucaccuc	90
45	<210> 135 <211> 85		

ES 2 703 133 T3

	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 135		
	cgcuaggcgac gggacauuau uacuuuuuggu acgcgcugug acacuucaaa cucguaccgu	60	
5	gaguaauaau gcgccgucca cggca	85	
	<210> 136		
	<211> 86		
10	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 136		
	ugccagucuc uagguccug agaccuuua accugugagg acauccaggg ucacagguga	60	
	gguucuuggg agccuggcgu cuggcc	86	
15	<210> 137		
	<211> 87		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
20	<400> 137		
	ucagagugag guaguagauu guauaguugu gggguaguga uuuuaccug uucaggagau	60	
	aacuauacaa ucuauugccu ucccuga	87	
	<210> 138		
	<211> 83		
25	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 138		
	uguggggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua cccaucuuug gagauaacua	60	
	uacagucuaac ugucuuuccc acg	83	
30	<210> 139		
	<211> 73		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
35	<400> 139		
	ggccggcugg gguuccuggg gaugggauuu gcuuccuguc aaaaucaca uugccagga	60	
	uuuccaaccg acc	73	
	<210> 140		
	<211> 92		
40	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 140		
	gggcagucuu ugcuacugua acauccuug acuggaagcu guaagguguu cagaggagcu	60	
	uucagucgga uguuuacagc ggcaggcugc ca	92	
45			

ES 2 703 133 T3

5	<p><210> 141 <211> 95 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i></p> <p><400> 141</p> <p>cucaucuguc uguugggcug gaggcagggc cuuugugaag gcggguggug cucagaucgc 60</p> <p>cucugggccc uuccuccagc cccgagggcg auuca 95</p>
10	<p><210> 142 <211> 70 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i></p>
15	<p><400> 142</p> <p>ggcaccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60</p> <p>gguccguguc 70</p>
20	<p><210> 143 <211> 94 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i></p> <p><400> 143</p> <p>ccaagccauu gagcgcugca ucccggccc ccuggcgacg gccucggcca cggccaucuc 60</p> <p>cggggaggca ggaauguggc gggcggggcu cugg 94</p>
25	<p><210> 144 <211> 100 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i></p>
30	<p><400> 144</p> <p>gugauccaca cucaaacugc ugacaacaua aaaccuuugu ccuugaagu cugaauuua 60</p> <p>aaauuuuaa aacauaaga auguuguuau gugagggccg 100</p>
35	<p><210> 145 <211> 130 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i></p> <p><400> 145</p> <p>cuaguggagg uacugugcuu uguguguugg aggaugaaag uacggaguga uccaucggcu 60</p> <p>aagugucuug ucacaaugcu gacacucaaa cugcugacag cacacguuuu ucacaguacu 120</p> <p>uacgccccag 130</p>
40	<p><210> 146 <211> 76 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i></p>
45	<p><400> 146</p>

	ucuuuacucc cacugcuuca cuugacuagc cuuuaaaaa gaaaggcuug guuugaugaa	60
	ugggugagag aaaagg	76
5	<210> 147 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
	<400> 147 cagtcattg gctgagtag tagttgt	28
15	<210> 148 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
	<400> 148 cagtcattg ggtgagtag tagattg	28
25	<210> 149 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 149 cagtcattg gctccctgag accctta	28
40	<210> 150 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética	
	<400> 150 cagtcattg ggtcgtaccg tgagtaat	28
50	<210> 151 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintética	
	<400> 151 cagtcattg gctaccacag ggtagaac	28
60	<210> 152 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Sintética		
5	<400> 152	cagtcatttg ggtgtagtgt ttctact	28
	<210> 153		
	<211> 28		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
15	<400> 153	cagtcatttg ggtcgaggag ctcacagt	28
	<210> 154		
	<211> 28		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
25	<400> 154	cagtcatttg ggcaacggaa tcccaaaa	28
	<210> 155		
30	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
35	<400> 155	cagtcatttg gctgtcagtt tgtcaaat	28
	<210> 156		
40	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 156	cagtcatttg gcatcacatt gccagggga	28
50	<210> 157		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 157	cagtcatttg gctggctcag tcagcag	28
60	<210> 158		
	<211> 28		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Sintética		
5	<400> 158	cagtcatttg gcttcacagt ggctaagt	28
	<210> 159		
	<211> 28		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
15	<400> 159	cagtcatttg gcaaggagct cacagtct	28
	<210> 160		
	<211> 28		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
25	<400> 160	cagtcatttg gctagcacca ttgaaat	28
	<210> 161		
30	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Sintética		
	<400> 161	cagtcatttg ggtgtaaaca tccccgac	28
40	<210> 162		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 162	cagtcatttg gccttcagt cggatggt	28
50	<210> 163		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 163	cagtcatttg gccctctggg ccctctct	28
60	<210> 164		
	<211> 28		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Sintética		
5	<400> 164		
	cagtcatttg gcgcccctgg gcctatcc	28	
	<210> 165		
	<211> 28		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
15	<400> 165		
	cagtcatttg gctcaagagc aataacga	28	
	<210> 166		
	<211> 28		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
25	<400> 166		
	cagtcatttg gccacgctca tgacaca	28	
	<210> 167		
	<211> 28		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
35	<400> 167		
	cagtcatttg gctgcggggc tagggcta	28	
	<210> 168		
	<211> 28		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
45	<400> 168		
	cagtcatttg gccacccgta gaaccgac	28	
	<210> 169		
	<211> 28		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
55	<400> 169		
	cagtcatttg gtcacaatg ctgacact	28	
	<210> 170		
	<211> 28		
60	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65			

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 170 cagtcatttg gctctccggg gaggcagg	28
10	<210> 171 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintética	
15	<400> 171 gcctcccact gcttcactg acta	24
20	<210> 172 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sintética	
25	<400> 172 ccgtttttt ttttaacca cac	23
30	<210> 173 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
35	<400> 173 ccgtttttt ttttaacta tac	23
40	<210> 174 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética	
45	<400> 174 ccgtttttt ttttcacag gtt	23
50	<210> 175 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintética	
55	<400> 175 ccgtttttt ttttcgcat tat	23
60	<210> 176 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<210> 176 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 176 ccgtttttt ttttccggtg gtt	23
10	<210> 177 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintética	
15	<400> 177 ccgtttttt ttttccata aag	23
20	<210> 178 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sintética	
25	<400> 178 ccgtttttt ttttactag act	23
30	<210> 179 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
35	<400> 179 cgttttttt ttttcagctg ct	22
40	<210> 180 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética	
45	<400> 180 ccgtttttt ttttggggt att	23
50	<210> 181 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintética	
55	<400> 181 ccgtttttt ttttggaaa tcc	23
60	<210> 182 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<210> 182 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 182 ccgtttttt ttttctgtt cct	23
10	<210> 183 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintética	
20	<400> 183 ccgtttttt ttttgcgga act	23
25	<210> 184 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 184 ccgtttttt ttttctcaa tag	23
40	<210> 185 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética	
50	<400> 185 ccgtttttt ttttaaccg att	23
55	<210> 186 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sintética	
65	<400> 186 ccgtttttt ttttctcc agt	23
70	<210> 187 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
75	<220> <223> Sintética	
80	<400> 187 ccgtttttt ttttgctgt aaa	23
85	<210> 188 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 188 ccgtttttt ttttactgg agg	23
10	<210> 189 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintética	
20	<400> 189 ccgtttttt ttttctagg ata	23
25	<210> 190 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 190 ccgtttttt ttttacatt ttt	23
40	<210> 191 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética	
50	<400> 191 ccgtttttt ttttgtggg tgt	23
55	<210> 192 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sintética	
65	<400> 192 ccgtttttt ttttgcgtg tag	23
70	<210> 193 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
75	<220> <223> Sintética	
80	<400> 193 ccgtttttt ttttcgcaa ggt	23
85	<210> 194 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Sintética		
5	<400> 194		
	ccgtttttt ttttgcag cag	23	
	<210> 195		
	<211> 23		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
15	<400> 195		
	ccgtttttt ttttcacat tcc	23	
	<210> 196		
	<211> 18		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
25	<400> 196		
	aaaaccgata gtgagtcg	18	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* de diagnóstico de riesgo aumentado de insuficiencia cardíaca crónica en un sujeto, comprendiendo el método:
- 10 determinar el perfil de expresión de las secuencias de micro-ARN en una muestra de suero previamente obtenida de dicho sujeto, comprendiendo dichas secuencias de micro-ARN la SEQ ID NO: 13, o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con la misma; y
 comparar dicho perfil de expresión con un perfil de expresión de referencia,
 10 en el que un nivel de expresión relativamente alto de la secuencia de micro-ARN que comprende la SEQ ID NO: 13 o que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con la misma en el perfil de expresión determinado en la muestra de suero, en comparación con dicho perfil de expresión de referencia, es diagnóstico de riesgo aumentado de insuficiencia cardíaca crónica.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el perfil de expresión determinado comprende además el nivel de expresión de al menos una secuencia de micro-ARN seleccionada de las SEQ ID NO: 1-12, 14-48 y 94-146, o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con la misma.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, en el que niveles de expresión relativamente altos de secuencias de micro-ARN seleccionadas de las SEQ ID NO: 1-12, 14-39, 94-97 y 119-122, o de secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas, en comparación con el perfil de expresión de referencia, son diagnósticos de riesgo aumentado de insuficiencia cardíaca.
- 25 4. El método de la reivindicación 2, en el que niveles de expresión relativamente bajos de secuencias de micro-ARN seleccionadas de las SEQ ID NO: 40-48, 98-118 y 123-146, o secuencias que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas, en comparación con el perfil de expresión de referencia, son diagnósticos de riesgo aumentado de insuficiencia cardíaca crónica.
- 30 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que los niveles de expresión de la secuencia de micro-ARN se determinan por hibridación de ácidos nucleicos, amplificación de ácidos nucleicos o una combinación de los mismos.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en el que el método de amplificación de ácidos nucleicos es PCR en tiempo real.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la PCR en tiempo real comprende el uso de cebadores directos e inversos, y en donde los cebadores directos comprenden una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 49-66, 86-89, 147-171, o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con las mismas.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, en el que el método de PCR en tiempo real comprende además el uso de una sonda.

Figura 1A

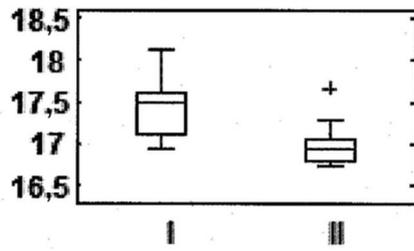


Figura 1B

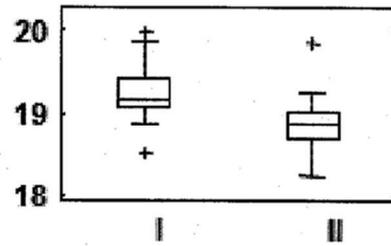


Figura 1C

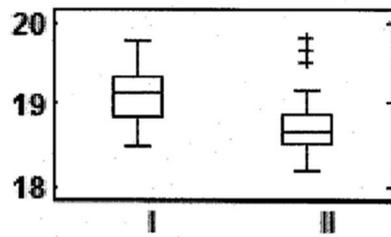


Figura 1D

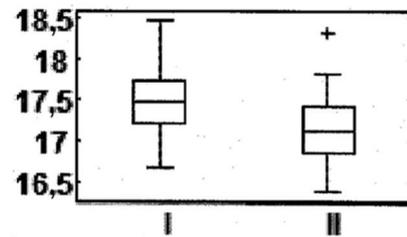


Figura 2A

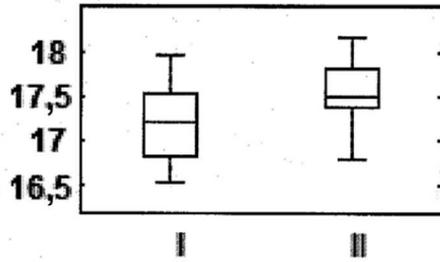


Figura 2B

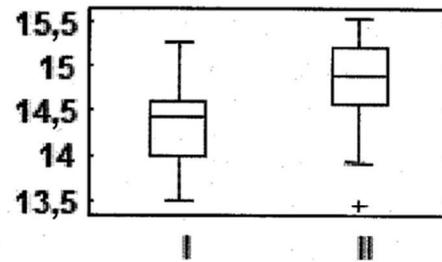


Figura 2C

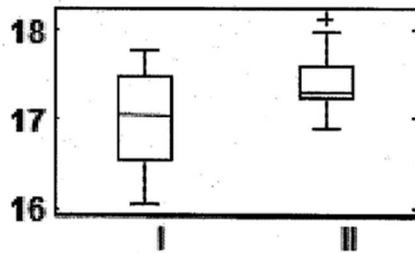


Figura 2D

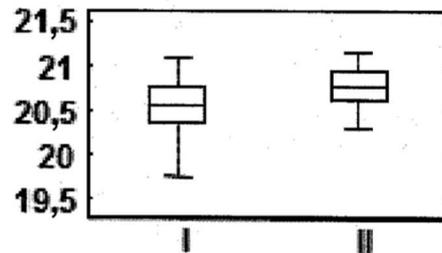


Figura 3

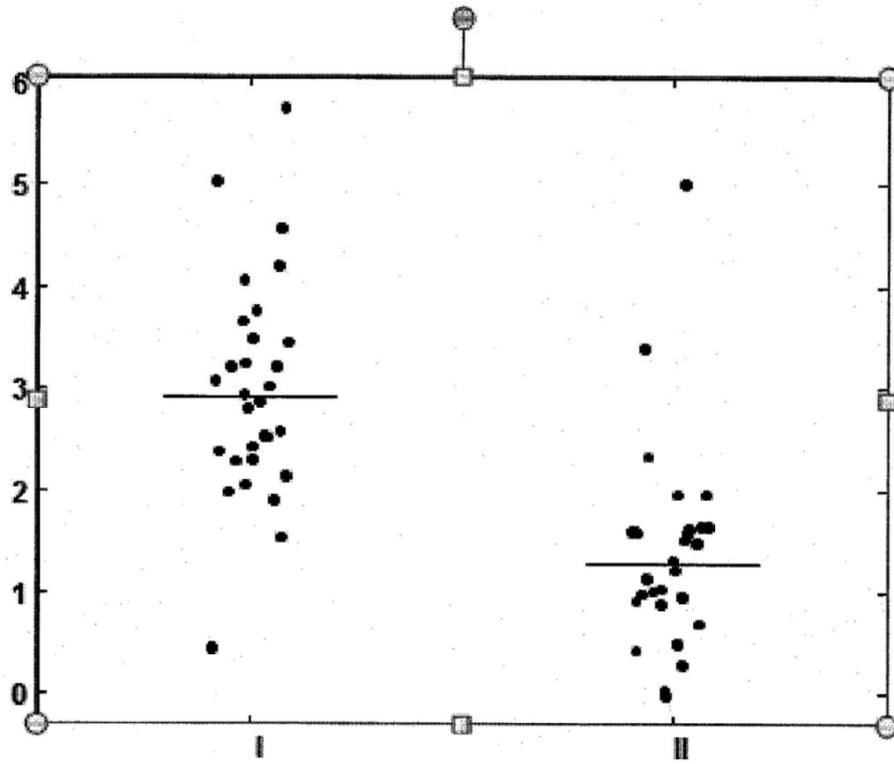


Figura 4

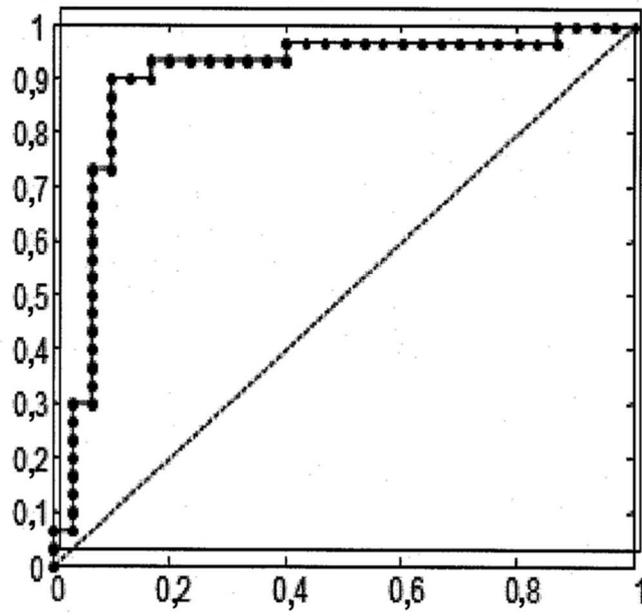


Figura 5

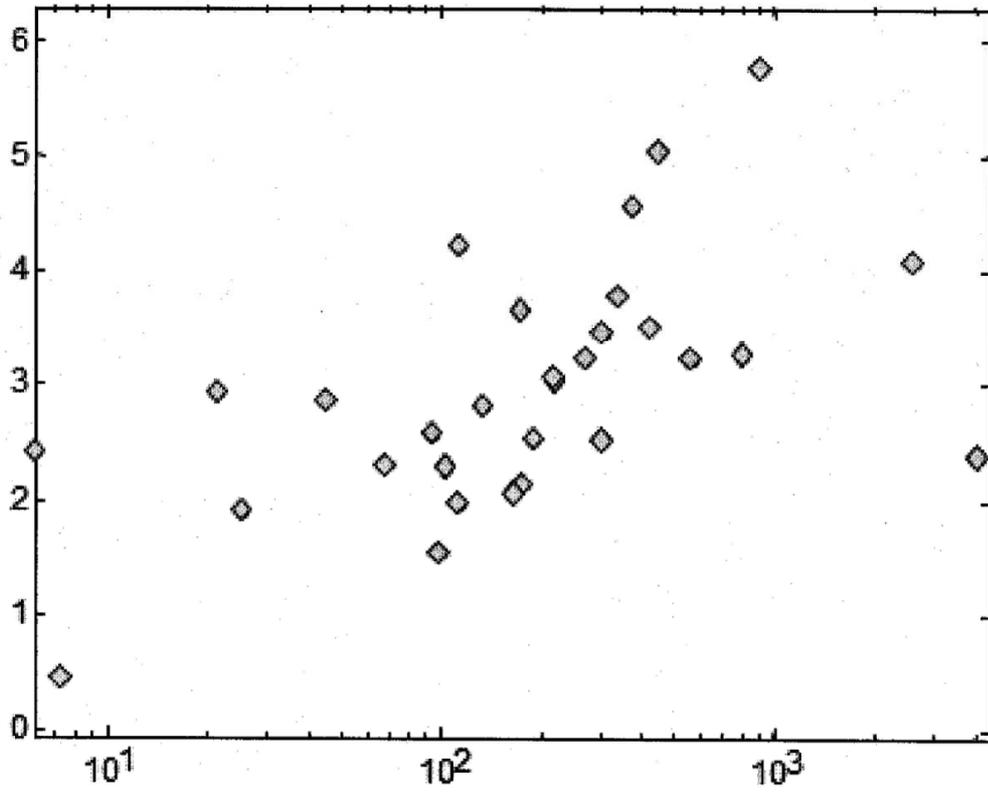


Figura 6

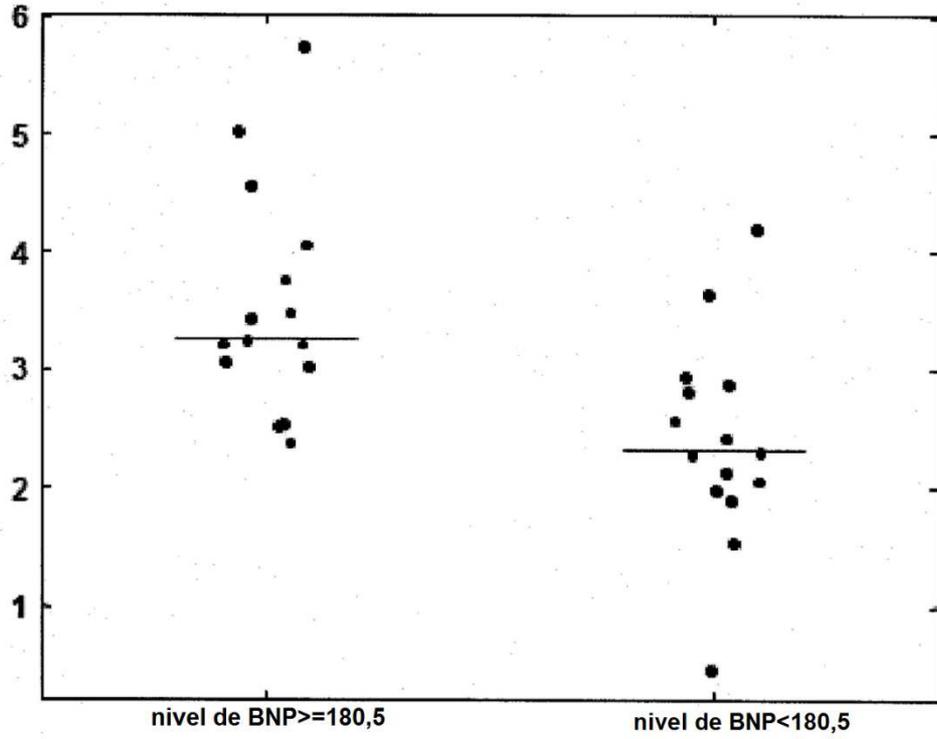


Figura 7

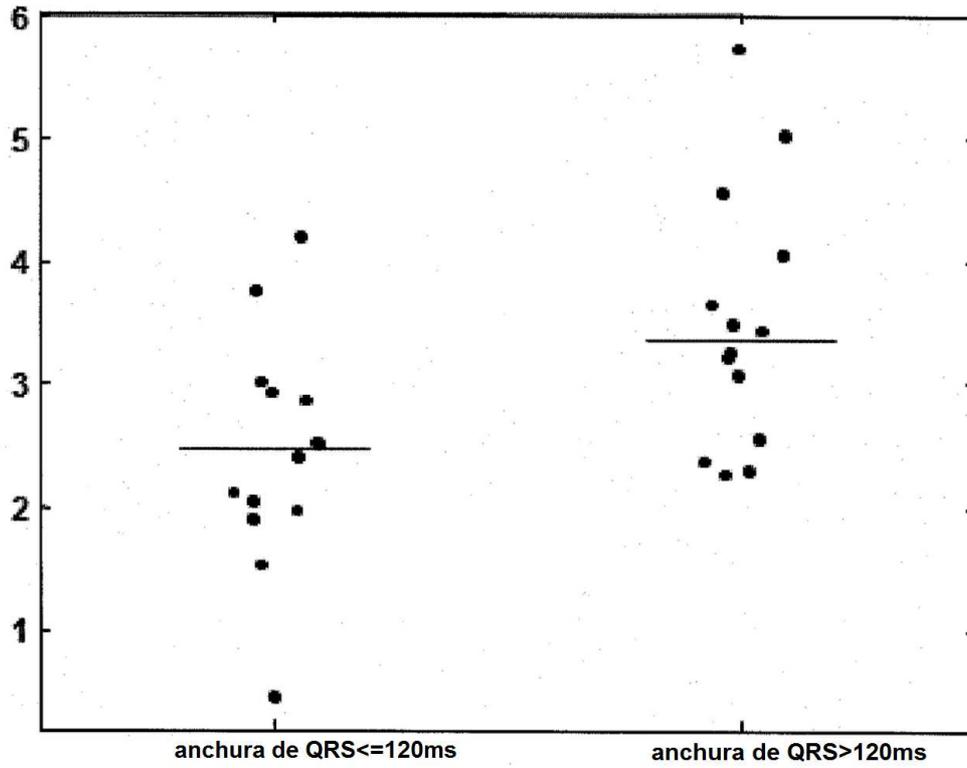


Figura 8

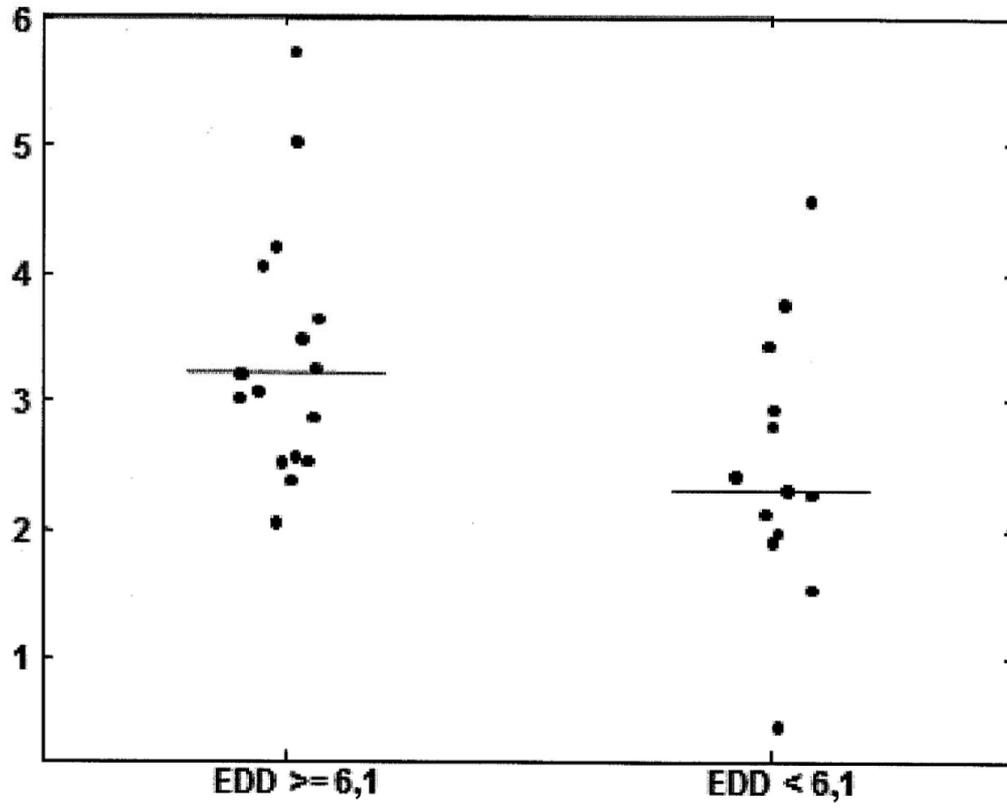


Figura 9

