

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 528**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2015 PCT/EP2015/055713**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2015 E 15710513 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3119905**

54 Título: **ARNs no codificantes mitocondriales para predecir la progresión de la enfermedad en pacientes con insuficiencia cardiaca e infarto de miocardio**

30 Prioridad:

18.03.2014 EP 14160577

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

04.06.2019

73 Titular/es:

**MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER
(20.0%)**

**Carl-Neuberg-Straße 1
30625 Hannover, DE;**

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.0%);**

INSTITUT PASTEUR DE LILLE (IPL) (20.0%);

**UNIVERSITÉ DE LILLE 2 (LILLE 2) - UNIVERSITY
OF LAW AND HEALTH (20.0%) y**

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE LILLE
(CHU) (20.0%)**

72 Inventor/es:

**THUM, THOMAS;
KUMARSWAMY, REGALLA;
PINET, FLORENCE;
DE GROOTE, PASCAL y
BAUTERS, CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 715 528 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

ARNs no codificantes mitocondriales para predecir la progresión de la enfermedad en pacientes con insuficiencia cardiaca e infarto de miocardio

5 La presente invención se refiere a un método para predecir la mortalidad de un paciente de ensayo con insuficiencia cardiaca crónica que comprende (a) detectar el nivel de expresión de uno o más ARN no codificantes largos (ARNInc) seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8, en el que el uno o más ARNInc es/son o comprende(n) el(los) ARNInc de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 en una muestra obtenida a partir de dicho paciente de ensayo con
10 insuficiencia cardiaca crónica, (b) comparar dicho nivel de expresión del uno o más ARNInc con el nivel de expresión de estos uno o más ARNInc en una muestra obtenida a partir de pacientes de control con insuficiencia cardiaca crónica, en el que los pacientes de control estuvieron vivos al menos aproximadamente tres años después del diagnóstico de la insuficiencia cardiaca crónica, y una sobreexpresión de al menos uno del uno o más ARNInc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces la en comparación con la de la muestra del paciente de control indica un aumento de la probabilidad de futura muerte cardiovascular del paciente de ensayo; y/o (b') comparar dicho nivel de expresión del uno o más ARNInc con el nivel de expresión de estos uno o más ARNInc en una muestra obtenida a partir de pacientes de control con insuficiencia cardiaca crónica, en el que los pacientes de control fallecieron por un suceso cardiovascular en aproximadamente el plazo de tres años después del diagnóstico de insuficiencia cardiaca crónica, y una subexpresión de al menos uno del uno o más ARNInc en la muestra del
20 paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra del paciente de control indica un aumento de la probabilidad de la supervivencia a largo plazo el paciente de ensayo, en el que las muestras son muestras de sangre. La presente invención también se refiere a un método para predecir remodelación cardiaca después del infarto de miocardio en un paciente de ensayo que comprende (a) detectar el nivel de expresión de uno o más ARNInc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8, en el que el uno o más ARNInc es/son o comprende(n) el(los) ARNInc de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 en una muestra obtenida a partir de dicho paciente de ensayo después del infarto de miocardio, y (b) comparar dicho nivel de expresión del uno o más ARNInc con el nivel de expresión de estos uno o más ARNInc en una muestra obtenida a partir de pacientes de control después del infarto de miocardio, en el que los pacientes de control no mostraron remodelación cardiaca después del infarto de miocardio, en el que (i) las muestras se obtuvieron a partir de dicho paciente de ensayo y de dichos pacientes de control dentro de un marco temporal de aproximadamente dos semanas después del infarto de miocardio, y una subexpresión de al menos uno del uno o más ARNInc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra del paciente de control indica futura remodelación cardiaca en el paciente de ensayo, y/o (ii) las muestras se obtuvieron a partir de dicho paciente de ensayo y de dichos pacientes de control más de aproximadamente dos semanas después del infarto de miocardio, y una sobreexpresión de al menos uno del uno o más ARNInc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra del paciente de control indica futura remodelación cardiaca en el paciente de ensayo, en el que las muestras son muestras de sangre.

40 La existencia de ácidos nucleicos extracelulares se conoce desde hace varias décadas (Mandel P y Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Acad Sci Paris. 1948; 142: 241-243). Por ejemplo, la expresión de ARN no codificantes largos se desveló en plasma durante insuficiencia cardiaca (Li D *et al.*, PLOS ONE. 2013; 8 (10) e77938). Un potencial de diagnóstico de ARN en los fluidos corporales en el cuerpo fue detectado después del descubrimiento inicial de los ARN extracelulares específicos en plasma de pacientes con cáncer (Kang Y y Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. Cell. 2004; 118: 277-279, y Antos CL *et al.*, Activated glicogen synthase-3 beta suppresses cardiac hipertrophy in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 907-912). Los ARN no codificantes largos (ARNInc) se definen convencionalmente como un transcrito de más de 200 nucleótidos de longitud sin capacidad de codificación de proteínas (Kung JT *et al.*, noncoding RNAs: past, present, and future. Genetics. 2013; 193: 651-669). El reconocimiento de los roles de los ARNInc en la enfermedad humana ha desvelado una nueva comprensión funcional y conducirá a nuevos enfoques de diagnóstico y terapéuticos (Batista PJ y Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. Cell. 2013; 152: 1298-1307). Los ARNInc a menudo forman estructuras secundarias, y relativamente más estables, que facilitan su detección como ácidos nucleicos libres en fluidos corporales como la orina y la sangre (Reis EM y Verjovski-Almeida S. Perspectives of Long Non-Coding RNAs in Cancer Diagnostics. Front Genet. 2012; 3: 32). Debido a su asociación bien establecida con diversos tipos de cáncer, los ARNInc se han investigado previamente por su papel potencial como biomarcadores de cáncer en fluidos corporales. Se ha identificado un ARNInc específico para próstata, PCA3, en la orina como el biomarcador más específico para la detección del cáncer de próstata con una especificidad más alta en comparación con el ensayo de PSA (antígeno específico de próstata) usado ampliamente (de Kok *et al.*, DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. Cancer Res. 2002; 62: 2695-2698; y Hessels D *et al.*, DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. Eur Urol. 2003; 44: 8-15; discusión 15-6). El análisis de PCA3 ha sido aprobado para la detección de cáncer de próstata y es comúnmente disponible para uso clínico. Además, otros estudios varios han resaltado el potencial de los ARNInc como biomarcadores candidatos para la detección de diversos cánceres (Kim K *et al.*, HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. Oncogene. 2013; 32: 1616-1625; Kumarswamy R y Thum T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. Circ Res. 2013; 113: 676-689; y Savoye C *et al.*, REmodelage VEntriculaire study group. Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (del grupo de estudio de REmodelación VEntricular

[REVE]). Am J Cardiol. 2006; 98: 1144-1149).

A pesar del uso potencial de los ARNInc como biomarcadores, para la gran mayoría de las enfermedades, en particular para enfermedades cardiovasculares, su papel como biomarcadores aún no se ha explorado. Sin embargo, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte (Hoyert D y Xu J. Deaths: Preliminary Data for 2011, Natl Vital Stat Rep. 2012; 61: 1-65). A pesar de los avances en la comprensión y el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (IC), todavía tienen mal pronóstico (Emdin M *et al.*, Old and new biomarkers of heart failure. Eur J Heart Fail. 2009; 11: 331-335). Por lo tanto, existe una continua necesidad de nuevos biomarcadores y métodos de diagnóstico para enfermedades cardiovasculares. Esta necesidad es abordada por la presente invención.

Por lo tanto la presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un método para predecir la mortalidad de un paciente de ensayo con insuficiencia cardíaca crónica que comprende (a) detectar el nivel de expresión de uno o más ARNInc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8, en el que el uno o más ARNInc es/son o comprende(n) el(los) ARNInc de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, en una muestra obtenida a partir de dicho paciente de ensayo con insuficiencia cardíaca crónica, (b) comparar dicho nivel de expresión del uno o más ARNInc con el nivel de expresión de estos uno o más ARNInc en una muestra obtenida a partir de pacientes de control con insuficiencia cardíaca crónica, en el que los pacientes de control estuvieron vivos al menos aproximadamente tres años después del diagnóstico de la insuficiencia cardíaca crónica, y una sobreexpresión de al menos uno del uno o más ARNInc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra del paciente de control indica un aumento de la probabilidad de futura muerte cardiovascular del paciente de ensayo; y/o (b') comparar dicho nivel de expresión del uno o más ARNInc con el nivel de expresión de estos uno o más ARNInc en una muestra obtenida a partir de pacientes de control con insuficiencia cardíaca crónica, en el que los pacientes de control fallecieron por un suceso cardiovascular en aproximadamente el plazo de tres años después del diagnóstico de insuficiencia cardíaca crónica, y una subexpresión de al menos uno del uno o más ARNInc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra de control de la muestra del paciente indica un aumento de la probabilidad de la supervivencia a largo plazo el paciente de ensayo, en el que las muestras son muestras de sangre.

Como se puede entender de la descripción de este método, el método comienza con muestras aisladas. Por consiguiente, el método se realiza en general *in vitro* y no comprende una etapa invasiva para obtener la muestra de un paciente.

El método de acuerdo con el primer aspecto de la invención también puede incluir detectar y comparar el nivel de expresión de uno o más ARNInc que son, con preferencia de menor a mayor, de al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 96 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, y al menos un 99,5 % idéntico a una cualquiera de las SEQ ID NOs 1 a 8. Los medios y métodos para determinar la identidad de secuencias se conocen en la técnica. Preferentemente, el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se usa para determinar la identidad de secuencias con respecto a uno o más ARNInc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8. El método de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede incluir adicionalmente detectar y comparar el nivel de expresión de uno o más ARNInc que difieren, con preferencia de menor a mayor, en no más de 10, tal como 5, 4, 3, o 1 nucleótido(s) de cualquiera de las SEQ ID NOs 1 a 8. Las diferencias en nucleótidos pueden ser de adición, delección y/o sustitución de nucleótido(s). Las secuencias de expresión de que se comparan, aunque sean homólogas, también se pueden diferenciar entre sí, con preferencia de menor a mayor, en no más de 10, tal como 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido(s).

La expresión "predicción de mortalidad", como se usa en el presente documento, define la probabilidad futura de que un paciente que padece insuficiencia cardíaca crónica muera de muerte cardiovascular o sobreviva a largo plazo. El largo plazo es, con preferencia de menor a mayor, de al menos aproximadamente 2 años, al menos aproximadamente 3 años y al menos aproximadamente 5 años.

En este sentido, la "muerte cardiovascular" es la muerte causada por una enfermedad cardiovascular, enfermedad que comprende, de acuerdo con la invención, una enfermedad cardíaca crónica. La expresión "suceso cardiovascular" se refiere a cualquier incidente que pueda causar daño al músculo cardíaco. La enfermedad cardiovascular es la causa principal de muerte en todo el mundo. Se calcula que 17,3 millones de personas murieron a causa de un suceso cardiovascular en 2008, lo que representa un 30 % de todas las muertes globales (Informe de estado global sobre enfermedades no transmisibles 2010, Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2011). De estas muertes, aproximadamente 7,3 millones se debieron a una enfermedad cardíaca coronaria y 6,2 millones se debieron a apoplejía. Se espera que el número de personas que mueran por sucesos cardiovasculares, principalmente por enfermedades cardíacas y apoplejía, aumente hasta alcanzar los 23,3 millones en 2030.

El término "insuficiencia cardíaca crónica" se refiere a que el corazón es incapaz de proporcionar suficiente acción de bombeo para mantener un flujo de sangre que satisfaga las necesidades del cuerpo. La insuficiencia cardíaca puede causar una serie de síntomas que incluyen dificultad para respirar, hinchazón de las piernas e intolerancia al ejercicio. La afección se diagnostica mediante examen físico del paciente y se confirma con ecocardiografía. Los análisis de sangre también pueden ayudar a determinar la causa. Causas comunes de insuficiencia cardíaca

incluyen infarto de miocardio y otras formas de enfermedad arterial coronaria, hipertensión, enfermedad cardíaca valvular y cardiomiopatía.

5 El término "muestra" se refiere a una muestra de tejido o preferentemente una muestra de fluido corporal. La muestra de fluido corporal se puede seleccionar entre sangre, suero, plasma, orina, saliva, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo y linfa. Las muestras utilizadas en los métodos de la invención son muestras de sangre, tales como muestras de suero o plasma. El "paciente" o "sujeto" a que se hace mención en el presente documento es el ser humano.

10 El término "ARNnc" o "RNA no codificante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ARN funcional que no se traduce en una proteína. La secuencia de ADN a partir de la cual se transcribe un ARN no codificante a menudo se denomina en la técnica un gen de ARN. El término "ARNInc" o "RNA no codificante largo" como se usa comúnmente en la técnica se refiere a un ARNnc que comprende más de 200 nucleótidos. Las SEQ ID NOs 1 a 8 cubren un intervalo de longitudes de 346 a 2509 nucleótidos.

15 La expresión "detectar el nivel de expresión de ARNnc" se refiere a determinar la cantidad o rendimiento del ARNnc. Los ARNInc se expresan inicialmente dentro de una célula. De acuerdo con la presente invención se encontró que los ARNInc de SEQ ID NOs 1 a 8 pueden ser detectados en la muestra de un paciente, en particular en una muestra de sangre, tal como muestra de suero o plasma. Esto muestra que los ARNInc abandonan las células y son estables fuera de las células (Véase la Fig. 7). Un ARNInc que está "expresado en una muestra" es, por lo tanto, un ARNInc cuyo nivel de expresión se puede detectar en la muestra por medios y métodos que se detallan adicionalmente a continuación en el presente documento. Por lo tanto, el nivel de expresión de uno o más ARNInc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8 puede ser detectado en una muestra tal como lo requieren los métodos de la invención. Un ARNnc está sobreexpresado en una muestra de ensayo si la cantidad o el rendimiento del ARNnc es mayor en comparación con la cantidad o el rendimiento del ARNnc correspondiente en una muestra de control. De forma análoga, un ARNnc está subexpresado en una muestra de ensayo si la cantidad o el rendimiento del ARNnc es menor en comparación con la cantidad o el rendimiento del ARNnc correspondiente en una muestra de control. En este contexto, el término "ARNnc correspondiente" se refiere a, por ejemplo, que el nivel de expresión del ARNInc de la SEQ ID NO: 1 en la muestra de ensayo se compara con el nivel de expresión del ARNInc de la SEQ ID NO: 1 en la muestra de control, o también que el nivel de expresión del ARNInc de SEQ ID NO: 2 en la muestra de ensayo se compara con el nivel de expresión del ARNInc de SEQ ID NO: 2 en la muestra de control. Esto se aplica *mutatis mutandis* para escenarios en los que se determina la expresión de más de un ARNInc seleccionado entre las SEQ ID NOs 1 a 8. Por ejemplo, si el nivel de expresión de los ocho ARNInc de las SEQ ID NOs 1 a 8 se determina en la muestra de ensayo, se compara con el nivel de expresión de los ocho ARNInc de las SEQ ID NOs 1 a 8 en la muestra de control.

40 El nivel de expresión en las muestras se puede cuantificar por cualquier medio y método adecuado disponible en la técnica. En general se pueden usar medios y métodos de cuantificación relativa y absoluta. En la cuantificación absoluta no se necesitan patrones o controles conocidos. El nivel de expresión se puede cuantificar directamente. Como se sabe bien en la técnica, la cuantificación absoluta puede depender de una curva estándar determinada previamente. En la cuantificación relativa, el nivel de expresión se cuantifica en relación con una referencia (tal como los niveles de expresiones de control conocidos). También en ausencia de controles, se puede cuantificar de forma relativa el nivel de expresión cuando se comparan, por ejemplo, las intensidades de fluorescencia. Los medios y métodos adecuados se detallan adicionalmente a continuación en el presente documento.

45 Cualquier método adecuado puede ser usado de acuerdo con la invención para determinar el nivel de expresión de uno o más de los ARNInc de SEQ ID NOS. 1 a 8. Los métodos para evaluar la concentración de ARN pueden comprender, por ejemplo, medir la intensidad de fluorescencia de colorantes que se unen a ácidos nucleicos y que emiten fluorescencia de forma selectiva cuando se unen. Los métodos de ese tipo comprenden una reacción de transcripción inversa y la producción de ADNc, en donde la cantidad de ADNc es determinada de ese modo determinando de forma indirecta la cantidad de RNA. El método basado en fluorescencia es particularmente útil para casos en los que la concentración de ARN es demasiado baja para evaluar con precisión mediante espectrofotometría y/o en casos en los que agentes contaminantes que absorben a 260 nm hacen que la cuantificación precisa por espectrofotometría sea difícil o imposible. Los métodos que comprenden la medición de la intensidad de fluorescencia se detallarán adicionalmente a continuación en el presente documento.

60 Al comparar el nivel de expresión de uno o más ARNInc entre las diferentes muestras, la confianza de la comparación mejora preferentemente al incluir un control endógeno invariable (expresión de un gen de referencia) para corregir posibles variaciones de muestra a muestra. Una normalización de ese tipo con respecto a un control endógeno invariable se lleva a cabo de forma rutinaria en la técnica. Por ejemplo, medios y métodos para la normalización del nivel de expresión, por ejemplo, en RT-PCR en tiempo real (véase, por ejemplo, Bustin, *Journal of Molecular Endocrinology*, (2002) 29, 23-39) o análisis de expresión de micromatrices (véase, por ejemplo, Calza y Balwitan, *Methods Mol Biol.* 2010; 673: 37-52), están bien establecidos. También se establecen métodos para la normalización de los niveles de expresión de pequeñas secuencias de ARN (véase, por ejemplo, Mestdagh *et al.* (2009) *Genome Biol.*; 10 (6): R64). En el caso en el que se usa la RT-PCR o una micromatriz para determinar los niveles de expresión de acuerdo con la presente invención, los niveles de expresión se normalizan preferentemente

con respecto a un spiked-in ARN (ARN que incluye una secuencia de referencia, véase, por ejemplo, McCormick *et al.* (2011), Silence, 2: 2). Cantidades conocidas de un spiked-in ARN se mezclan con la muestra durante la preparación. Más preferentemente al ARN se le incluye una secuencia de referencia de forma externa en plasma y/o suero antes de realizar el proceso de aislamiento del ARN, en cuyo caso las muestras son plasma y/o suero. La tecnología de spiked-in ARN es bien conocida y hay kits comerciales disponibles de diferentes fabricantes. El spiked-in ARN es preferentemente un spiked-in ARN de *C. elegans*.

La muestra de ensayo y la muestra de control se obtienen preferentemente a partir de los pacientes con insuficiencia cardiaca crónica directamente después de que a dichos pacientes se les haya diagnosticado insuficiencia cardiaca crónica. En este sentido, "directamente" se refiere, con preferencia de menor a mayor, dentro de un marco temporal de aproximadamente 3 meses, aproximadamente 1 mes, aproximadamente dos semanas y aproximadamente una semana.

Aunque numerosos estudios han investigado ARN pequeños tales como los microARN (miARN) como biomarcadores potenciales para la insuficiencia cardiaca (IC) (Kumarswamy R y Thum T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res.* 2013; 113: 676-689), la utilidad diagnóstica de los ARNinc circulantes en enfermedades cardiacas, hasta donde saben los inventores, nunca han investigado. Los ejemplos que siguen a continuación en el presente documento ponen en evidencia el potencial del uso de los niveles de expresión de los ARNinc de SEQ ID NOs 1 a 8 en una muestra, en particular en una muestra de plasma, como biomarcadores de pronóstico de insuficiencia cardiaca. La identificación sistemática inicial del ARNinc que condujo a la identificación de los ARNinc de SEQ ID NOs 1 a 8 se realizó de acuerdo con el nivel de remodelación del ventrículo izquierdo (VI) en un estudio ecocardiográfico prospectivo de pacientes después del infarto de miocardio (IM). La remodelación del VI, que sigue siendo frecuente en la práctica clínica moderna (Savoye C *et al.*, Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (del grupo de estudio de RE remodelación VEntricular [REVE]). *Am J Cardiol.* 2006; 98: 1144-1149) es un sustituto bien conocido de la IC después de IM (St John Sutton M *et al.*, Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. *Circulation.* 1994; 89: 68-75). El ARNinc de SEQ ID NO: 1 se sometió a ensayo para determinar su asociación con la IC, y su valor de pronóstico en otras dos poblaciones independientes de pacientes con insuficiencia cardiaca sistólica.

De acuerdo con la invención se ha encontrado que todos los ARNinc de SEQ ID NOs 1 a 8 están codificados por el genoma mitocondrial. La expresión del genoma mitocondrial está bien estudiada. Se sabe que la transcripción de ambas cadenas, pesada (H) y ligera (L) del ADNmt, da lugar a grandes transcripciones policistrónicas que cubren casi todo el genoma (Shabel (2008), *Am J Pathol*, 172 (6): 1445-1456). Estas largas transcripciones mitocondriales precursoras son procesadas para formar ARN funcionales, así como ARNnc. Además, la expresión del genoma mitocondrial está regulada por un pequeño conjunto de componentes celulares, que incluye principalmente una ARN polimerasa monomérica (POLRMT) y factores de transcripción mitocondrial, A (TFAM) y B2 (TFB2M) (Falquenberg, *et al.* (2007), *Annu Rev Biochem* 76: 679-99). Por lo tanto, es evidente que los niveles de expresión de los ARNinc de SEQ ID NOs 1 a 8 están relacionados entre sí y se controlan mediante una maquinaria celular común.

Como se ha explicado anteriormente, todos los ARNinc de SEQ ID NOs 1 a 8 se estudiaron en pacientes poco después del infarto de miocardio (IM). Se encontró que todas las SEQ ID NOs 1 a 8 están subexpresadas poco después de IM en pacientes que posteriormente desarrollaron remodelación del ventrículo izquierdo (VI). Además, los ARNinc de SEQ ID NO: 1 se sometieron a ensayo para su asociación con IC. De forma inesperada se encontró que la SEQ ID NO: 1 está sobreexpresada (a diferencia de una subexpresión directamente después de la IM) en pacientes de insuficiencia cardiaca crónica que fallecieron en el plazo de tres años después del diagnóstico inicial de la insuficiencia cardiaca crónica. Aunque esto solo se confirmó experimentalmente para la SEQ ID NO: 1 es evidente, en vista de (i) el nivel de expresión relacionado y comúnmente controlado de los transcritos mitocondriales, así como (ii) el hecho de que después de IM todas las SEQ ID NOs 1 a 8 se comportan del mismo modo - en particular con subexpresión - que los ARNinc de las SEQ ID NOs 2 a 8 se comportan tal como la SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, también se espera que los ARNinc de SEQ ID NOs 2 a 8 estén sobreexpresados en pacientes con insuficiencia cardiaca crónica que fallecieron en el plazo de tres años después del diagnóstico inicial de la insuficiencia cardiaca crónica.

De acuerdo con una realización preferente del primer aspecto de la invención, la insuficiencia cardiaca crónica es insuficiencia cardiaca sistólica.

La insuficiencia cardiaca diastólica (ICD) y la insuficiencia cardiaca sistólica (ICS) son los dos subgrupos clínicos comunes de insuficiencia cardiaca crónica (Chatterjee *et al.* (2007), *Journal of Cardiac Failure* 13 (7): 569-576). La disfunción sistólica se debe a un deterioro de la función contráctil o de bombeo del corazón, mientras que la disfunción diastólica se debe a un deterioro de la relajación ventricular. El cumplimiento no siempre está asociado con la insuficiencia cardiaca clínica caracterizada por signos y síntomas de bajo gasto cardiaco o de congestión. Además, en la ICS, es común la disfunción diastólica evaluada por cambios en las características de llenado ventricular, en particular en la insuficiencia cardiaca avanzada. En la insuficiencia cardiaca diastólica, el funcionamiento sistólico del ventrículo izquierdo, la función y la contractilidad en general, se mantienen normales. Para diagnosticar si una insuficiencia cardiaca crónica es ICD o ICS, se mide la fracción de eyección del ventrículo

izquierdo. Si la fracción de eyección se conserva, es ICD, y si se reduce, es ICS.

En la insuficiencia cardiaca sistólica, aproximadamente un 50 % de las muertes son repentinas y la tasa de muerte súbita en la insuficiencia cardiaca sistólica es de 6 a 9 veces más elevada en comparación con la de la población general (American Heart Association. Heart disease and stroke statistics 2003 update. Dallas, TX: American Heart Association; 2002). Por lo tanto, es de particular relevancia proporcionar métodos para predecir la mortalidad de un paciente con insuficiencia cardiaca sistólica.

La presente invención se refiere en un segundo aspecto a un método para predecir remodelación cardiaca después del infarto de miocardio en un paciente de ensayo que comprende (a) detectar el nivel de expresión de uno o más ARNInc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8, en el que el uno o más ARNInc es/son o comprende(n) el(los) ARNInc de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, en una muestra obtenida de dicho paciente de ensayo después del infarto de miocardio, y (b) comparar dicho nivel de expresión del uno o más ARNInc con el nivel de expresión de estos uno o más ARNInc en una muestra obtenida de pacientes de control después del infarto de miocardio, en el que los pacientes de control no mostraron remodelación cardiaca después del infarto de miocardio, en el que (i) las muestras se obtuvieron de dicho paciente de ensayo y de dichos pacientes de control dentro de un marco temporal de aproximadamente dos semanas después del infarto de miocardio, y una subexpresión de al menos uno del uno o más ARNInc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra del paciente de control indica futura remodelación cardiaca en el paciente de ensayo, y/o (ii) las muestras se obtuvieron de dicho paciente de ensayo y de dichos pacientes de control más de aproximadamente dos semanas después del infarto de miocardio, y una sobreexpresión de al menos uno del uno o más ARNInc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra del paciente de control indica futura remodelación cardiaca en el paciente de ensayo, en el que las muestras son muestras de sangre.

Como también se puede observar a partir de las expresiones de este método, el método comienza usando muestras aisladas. Por consiguiente, el método se realiza en general *in vitro* y no comprende una etapa invasiva para obtener la muestra a partir de un paciente.

El método del segundo aspecto de la invención puede también incluir detectar y comparar el nivel de expresión de uno o más ARNInc siendo, con preferencia de menor a mayor, de al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 96 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, y al menos un 99,5 % idéntico a cualquiera de las SEQ ID NOs 1 a 8. El método de acuerdo con el segundo aspecto de la invención puede incluir adicionalmente detectar y comparar el nivel de expresión de uno o más ARNInc que difieren, con preferencia de menor a mayor, en no más de 10, tal como 5, 4, 3, 2 o 1, nucleótido(s) de cualquiera de las SEQ ID NOs 1 a 8. Las secuencias cuya expresión se compara, aún siendo homólogas, se pueden diferir también entre sí, con preferencia de menor a mayor, en no más de 10, tal como 5, 4, 3, 2 o 1, nucleótido(s).

La expresión "infarto de miocardio" o "IM" define un suceso comúnmente conocido como ataque cardiaco. Se produce cuando la sangre cesa de fluir adecuadamente a parte del corazón y el músculo cardiaco se lesiona debido a un suministro de oxígeno insuficiente. Normalmente esto se produce porque una de las arterias coronarias que suministra sangre al corazón desarrolla un bloqueo, por ejemplo, debido a una acumulación inestable de glóbulos blancos, colesterol y grasa.

La expresión "remodelación cardiaca", tal como se usa en el presente documento, se refiere a los cambios de tamaño, forma, estructura y fisiología del corazón después de IM. Después de IM, se puede producir una serie de cambios histopatológicos y estructurales, que, en la mayoría de los casos, implican al ventrículo izquierdo del miocardio y conducen a un deterioro progresivo del rendimiento del ventrículo izquierdo. Por último, la remodelación cardiaca puede dar como resultado una disminución de la función contráctil (sistólica) y una reducción del volumen de apoplejía.

Todos los ARNInc de SEQ ID NOs 1 a 8 se estudiaron en pacientes poco después del infarto de miocardio (IM). Con más detalle, las muestras se obtuvieron de los pacientes al momento del alta, que en general no es más de aproximadamente dos semanas después, calculadas desde el suceso del infarto de miocardio. Se encontró que todas las SEQ ID NOs 1 a 8 están subexpresadas poco después de IM en pacientes que más tarde desarrollarían una remodelación del ventrículo izquierdo (VI). En una ampliación del estudio, se obtuvieron también muestras de los pacientes en un estadio posterior después de IM, en particular 1 mes, 3 meses y 12 meses después de IM. Tal como se puede observar en los ejemplos que siguen a continuación en el presente documento, se encontró de forma sorprendente que el ARNInc de SEQ ID NO: 1 está sobreexpresado en estos estadios tardíos después de IM en pacientes que posteriormente desarrollaron remodelación del ventrículo izquierdo (VI). Aunque esto solamente se confirmó por vía experimental para SEQ ID NO: 1, es evidente de nuevo, en vista (i) del nivel de expresión relacionado y comúnmente controlado de transcritos mitocondriales así como (ii) del hecho de que después de IM todas las SEQ ID NOs 1 a 8 se comportan del mismo modo, que los ARNInc de SEQ ID NOs 2 a 8 se comportan tal como la SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, también se espera que los ARNInc de las SEQ ID NOs 2 a 8 estén sobreexpresados en estadios posteriores después de IM en pacientes que posteriormente desarrollaron remodelación del ventrículo izquierdo (VI). La remodelación del VI fue seleccionada para preparar los ejemplos de la invención como un medio para determinar la remodelación cardiaca debido a que la mayor parte de la remodelación

cardiaca se caracteriza por remodelación del VI. Sin embargo, el método de acuerdo con el segundo aspecto no se limita a la predicción de la remodelación del VI sino que también se puede usar para predecir la remodelación cardiaca en general.

5 De acuerdo con el segundo aspecto de la invención, la muestra que es obtenida de pacientes de control después de un infarto de miocardio se obtiene con un aumento de la preferencia dentro del plazo de aproximadamente 3 meses, de aproximadamente 2 meses, de aproximadamente 1 mes, de aproximadamente dos semanas, de aproximadamente 10 días y de aproximadamente 1 semana después del infarto de miocardio.

10 De acuerdo con una realización preferente del segundo aspecto de la invención, la remodelación cardiaca comprende o es una remodelación del ventrículo izquierdo.

Tal como se describe, la medición de la remodelación del VI fue usada en los ejemplos que siguen a continuación en el presente documento para determinar si un paciente padece remodelación cardiaca. De acuerdo con la invención, la remodelación del VI se define como un cambio de más de un 20 % en el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (VDFVI) entre el valor inicial (es decir, directamente después del IM) y 12 meses después del IM.

De acuerdo con una realización preferente adicional del segundo aspecto de la invención, el marco temporal de aproximadamente dos semanas es un marco temporal de aproximadamente 10 días, preferentemente un marco temporal de aproximadamente 7 días. De acuerdo con otra realización preferente del segundo aspecto de la invención, las más de aproximadamente dos semanas son más de aproximadamente tres semanas, preferentemente más de aproximadamente cuatro semanas.

En este sentido, el término "aproximadamente" es preferentemente ± 1 día. La expresión "marco temporal de aproximadamente dos semanas" se refiere a "aproximadamente 14 días o menos", el marco temporal de aproximadamente 10 días se refiere a "aproximadamente 10 días o menos", y el marco temporal de aproximadamente 7 días se refiere a "aproximadamente 7 días o menos". Más de aproximadamente dos semanas se refiere a "más de aproximadamente 14 días", más de aproximadamente tres semanas se refiere a "más de aproximadamente 21 días", más de aproximadamente cuatro semanas se refiere a "más de aproximadamente 28 días". Las muestras sometidas a ensayo fueron obtenidas de pacientes con IM, por un lado, directamente después del IM (es decir, en el momento del alta) y, de nuevo, 1 mes y más tarde después del IM. Aunque la subexpresión de los ARNInc poco después del IM indica futura remodelación cardiaca, el escenario es diferente en una etapa posterior después del IM. En una etapa posterior después de IM, la sobreexpresión de los ARNInc indica futura remodelación cardiaca. Se cree que el punto de inversión en el tiempo del nivel de expresión es aproximadamente dos semanas después del suceso de IM. Se espera que el marco temporal varíe entre pacientes. Por lo tanto, en realizaciones preferentes adicionales, el marco temporal de dos semanas es un marco temporal de 10 días, preferentemente un marco temporal de 7 días y/o las más de dos semanas son más de tres semanas, preferentemente más de cuatro semanas.

40 De acuerdo con una realización preferente del primer y segundo aspectos de la invención, la sub- y/o sobreexpresión superior a 2 veces, es una sub- y/o sobreexpresión superior a 2,5 veces, preferentemente es una sub- y/o sobreexpresión superior a 3 veces.

De acuerdo con la presente divulgación, una sub- y/o sobreexpresión de 2 veces de al menos uno de los ARNInc de SEQ ID NOs 1 a 8 es de valor suficiente para predecir la remodelación cardiaca después del infarto de miocardio y/o predecir la mortalidad de un paciente con insuficiencia cardiaca crónica. Sin embargo, también se sabe que el nivel de confianza del método de diagnóstico puede aumentar mediante el aumento del umbral del nivel de expresión que se supone que es indicativo de un cierto suceso. Por esta razón, la sub- y/o sobreexpresión superior a 2 veces es preferentemente una sub- y/o sobreexpresión superior a 2,5 veces, más preferentemente una sub- y/o sobreexpresión superior a 3 veces.

De acuerdo con el primer y segundo aspectos de la invención, el paciente de ensayo y los pacientes de control se pueden emparejar de acuerdo a, uno o más, edad, sexo, diabetes mellitus, etiología de insuficiencia cardiaca, y raza.

55 Tal como se puede observar a partir de la leyenda de la Figura 3, los resultados mostrados en la Figura 3 se ajustaron en edad (59 años en ambas cohortes analizadas) y sexo (8 % de mujeres en ambas cohortes analizadas). El emparejamiento del paciente de ensayo y los pacientes de control mediante, uno o más de, edad, sexo, diabetes mellitus, etiología de insuficiencia cardiaca, y raza aumentará adicionalmente la confianza de los métodos de la invención, ya que se puede excluir cualquier diferencia potencial en el nivel de expresión causada por diferencias en edad, sexo, diabetes mellitus, etiología de insuficiencia cardiaca, y/o raza.

De acuerdo con el primer y segundo aspectos de la invención, los pacientes de control pueden ser al menos 3 pacientes, preferentemente al menos 5 pacientes, y más preferentemente al menos 10 pacientes.

65 Se espera que el aumento del número de pacientes a al menos 3 pacientes, preferentemente al menos 5 pacientes, y más preferentemente al menos 10 pacientes de control aumente adicionalmente la confianza de los métodos de la

invención, porque las anomalías potenciales en el nivel de expresión en un paciente de control dado son normalizadas debido a los otros pacientes de control.

5 De acuerdo con otra realización preferente del primer y segundo aspectos de la invención, la detección del nivel de expresión del uno o más ARNInc comprende (i) PCR cuantitativa, preferentemente PCR cuantitativa en tiempo real, o (ii) un método de amplificación de molde/ARN seguido de la determinación del nivel de expresión del uno o más ARNInc usando un método de cuantificación basada en fluorescencia o luminiscencia.

10 En la PCR cuantitativa (qPCR), la cantidad de producto amplificado se relaciona con la intensidad de fluorescencia usando una molécula indicadora fluorescente. El punto en el que se mide la señal fluorescente con el fin de calcular la cantidad del molde inicial puede ser al final de la reacción (PCR semi-cuantitativa en el punto final) o mientras la amplificación todavía está progresando (qPCR en tiempo real).

15 En la PCR semi-cuantitativa en el punto final, los datos de fluorescencia se recogen después de haber completado la reacción de amplificación, normalmente después de 30-40 ciclos, y esta fluorescencia final se usa para volver a calcular la cantidad de molde presente antes de la PCR.

20 El método, más sensible y reproducible, qPCR en tiempo real mide la fluorescencia en cada ciclo a medida que la amplificación progresa. Esto permite que la cuantificación del molde se base en la señal de fluorescencia durante la fase exponencial de la amplificación, antes de que reactivos limitantes, acumulación de inhibidores, o inactivación de la polimerasa hayan comenzado a tener un efecto en la eficacia de la amplificación. Las lecturas de fluorescencia en estos ciclos iniciales de la reacción medirán la cantidad de molde amplificado en donde la reacción es mucho más reproducible, de muestra a muestra, que en el punto final.

25 Un ejemplo no limitante de un método de amplificación de molde/ARN seguido de la determinación del nivel de expresión del uno o más ARNInc usando un método de cuantificación basado en fluorescencia o luminiscencia es un método que combina la amplificación mediada por la transcripción (AMT) y un ensayo de protección de la hibridación (EPH). Con más detalle, un método de ese tipo puede comprender la hibridación de uno o más oligonucleótidos ("oligonucleótidos de captura") que son complementarios a las SEQ ID NOs 1 a 8. En el caso en el que se tengan
30 como diana dos o más SEQ ID NOs 1 a 8, se usa un oligonucleótido de captura individual para cada secuencia seleccionada entre las SEQ ID NOs 1 a 8. Las secuencias hibridadas diana son capturadas a continuación sobre micropartículas magnéticas que son separadas de la muestra con un campo magnético. Se pueden usar etapas de lavado para retirar componentes extraños. La amplificación de la diana normalmente se produce a través de TMA, que es un método de amplificación de ácido nucleico basado en la transcripción que usa dos enzimas, transcriptasa
35 inversa del virus de leucemia murina de Moloney (VLMM) y ARN polimerasa T7. se usa un juego único de cebadores para cada secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NOs 1 a 8. La transcriptasa inversa se usa para generar una copia de ADN (que contiene la secuencia promotora para la ARN polimerasa T7) de la secuencia diana. La ARN polimerasa T7 produce múltiples copias de amplicón de ARN a partir de las copias de ADN. La detección del nivel de expresión del ARNInc se consigue mediante HPA usando sondas de ácidos nucleicos de una sola hebra, etiquetadas por luminiscencia, que son complementarias al uno o más amplicones. Preferentemente, para cada amplicón diana se usan sondas cuya etiqueta es identificable. Las sondas de ácidos nucleico etiquetadas hibridizan de forma específica al amplicón. A continuación, un " reactivo de selección" diferencia entre sondas hibridadas y no hibridadas mediante la inactivación de la etiqueta en sondas sin hibridar. Durante la etapa de detección, la señal de quimioluminiscencia producida por la sonda hibridada se mide en un luminómetro y se recoge como "Unidades
40 Relativas de Luz" (URL), cuantificando de ese modo el nivel de expresión del ARNInc.

De acuerdo con una realización más preferente del primer y segundo aspectos de la invención, el uno o más ARNInc comprende(n) la SEQ ID NO: 1 y las secuencias de cebadores de las SEQ ID NOs 19 y 20 se usan en la PCR para la detección del nivel de expresión of SEQ ID NO: 1.

50 Tal como se infiere de los ejemplos que siguen a continuación en el presente documento, el primer par de cebadores de SEQ ID NOs 19 y 20 fue usado de forma ventajosa por los inventores en el contexto de la medición del nivel de expresión de los ARNInc de SEQ ID NO: 1.

55 La presente invención se refiere, en un tercer aspecto, a un método para determinar si un paciente tiene o presenta riesgo de desarrollar una insuficiencia cardiaca, que comprende detectar la expresión de uno o más ARNInc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8, en el que el uno o más ARNInc es/son o comprende(n) el(los) ARNInc de la SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, en una muestra obtenida de dicho paciente, en el que el paciente tiene o presenta riesgo de desarrollar una insuficiencia cardiaca si la expresión de uno o más ARNInc seleccionados entre
60 las SEQ ID NOs 1 a 8 se detecta en la muestra, en el que el uno o más ARNInc es/son o comprende(n) el ARNInc(s) de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, en el que la muestra es una muestra de sangre.

El método de acuerdo con el tercer aspecto de la invención también puede incluir detectar el nivel de expresión de uno o más ARNInc que son, con preferencia de menor a mayor, al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un
65 94 %, al menos un 96 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, y al menos un 99,5 %, idénticos a cualquiera de las SEQ ID NOs 1 a 8. El método de acuerdo con el tercer aspecto de la invención puede incluir adicionalmente detectar

el nivel de expresión de uno o más ARNInc que difieren, con preferencia de menor a mayor, en no más de 10, tal como 5, 4, 3, 2 o 1, nucleótido(s) de cualquiera de las SEQ ID NOs 1 a 8.

5 En la presente divulgación se encontró de forma sorprendente que la expresión de las SEQ ID NOs 1 a 8 no se podía detectar en sujetos sanos sino solamente en pacientes después de IM o en pacientes con una insuficiencia cardiaca. De ello resulta que la expresión de las SEQ ID NOs 1 a 8 en muestras obtenidas a partir de sujetos sanos está ausente o por debajo del límite de detección. El límite de detección es preferentemente un valor Ct (umbral de ciclo) de más de 34 en una PCR en tiempo real, preferentemente más de 36, más preferentemente más de 38, y el más preferentemente más de 40. En un ensayo de PCR en tiempo real se detecta una reacción positiva debido a la
10 acumulación de una señal de fluorescencia. El Ct se define como el número de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia atraviese el umbral (es decir, supere el nivel de fondo). Los niveles Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra (es decir, cuanto más bajo es el nivel Ct mayor es la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra).

15 Por lo tanto, la detección de la expresión de una o más de las SEQ ID NOs 1 a 8 en una muestra de un paciente indica que el paciente tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar una insuficiencia cardiaca. Si el paciente tiene o está en riesgo de desarrollar una insuficiencia cardiaca se puede evaluar adicionalmente mediante un diagnóstico del corazón rutinario. Ejemplos no limitantes de diagnósticos rutinarios son ecocardiografía o un electrocardiograma.

20 De acuerdo con una realización preferente del primer, segundo y tercer aspectos de la invención, el uno o más ARNInc es o comprende el ARNInc de la SEQ ID NO: 1.

Tal como se demuestra en los ejemplos, el ARNInc de SEQ ID NO: 1 (designado como uc022bqs.1 en los ejemplos) tenía la asociación más elevada con la remodelación de VI poco después de IM, de entre el ARNInc mitocondrial de
25 SEQ ID NOs 1 a 8. Por lo tanto, la SEQ ID NO: 1 se ha seleccionado para estudiar la asociación con la remodelación de VI posterior después de IM y con la asociación a IC. Por estas razones el uso del ARNInc de SEQ ID NO: 1 es el más preferente entre el uso del ARNInc de SEQ ID NOs 1 a 8.

30 En el contexto del primer, segundo y tercer aspectos de la invención, el uno o más ARNInc es o comprende el ARNInc de la SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2. Tal como se puede inferir de los ejemplos, se mostró que ambos ARNInc de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 eran independientemente predictivos de futura remodelación cardiaca en pacientes.

35 De acuerdo con una realización preferente adicional del primer, segundo y tercer aspectos de la invención, las muestras de sangre son muestras de plasma.

El término "muestra de sangre" incluye sangre completa, así como cualquier muestra obtenida a partir de la sangre, en particular plasma o suero. La muestra de sangre más preferente es una muestra de plasma.

40 De acuerdo con una realización preferente diferente del primer, segundo y tercer aspectos de la invención, el método comprende, antes de la detección del nivel de expresión del ARN no codificante largo, una etapa de amplificación previa del ARN dentro de la muestra del paciente de ensayo y/o de la muestra del paciente de control.

45 La realización de una etapa de amplificación previa es particularmente ventajosa en el caso de tener solamente disponible de una cantidad baja de muestra (ensayo y/o control). La etapa de amplificación previa permite el aumento de la cantidad de ARN dentro de la muestra antes de proceder al análisis del nivel de expresión. Los medios y métodos para la amplificación previa de ARN son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Vermeulen *et al* (2009) BMC Res Notas., 2:235). En el caso en el que el ARN en la muestra, tanto de ensayo como de control, se amplifique previamente, se usará preferentemente el mismo método para la etapa de amplificación
50 previa, de modo que la cantidad relativa de ARN de la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control se mantiene. En el caso de que solamente el ARN de la muestra de ensayo o de control se amplifique previamente o las dos muestras de ARN se amplifiquen previamente mediante diferentes métodos, puede ser que los datos de niveles de expresión se tengan que normalizar para la etapa de amplificación previa; véase, por ejemplo Mestdagh *et al.* (2009), Genome Biology 2009, 10:R64.

55 De acuerdo con otra realización preferente adicional del primer, segundo y tercer aspectos de la invención, el uno o más ARNInc son al menos 3 ARNInc, preferentemente al menos 5 ARNInc, y más preferentemente todos los 8 ARNInc.

60 El uso de al menos 3 ARNInc, preferentemente al menos 5 ARNInc, y más preferentemente todos los 8 ARNInc de SEQ ID NOs 1 a 8 aumentará adicionalmente la confianza de los métodos de la invención. Aunque todos los ARNInc de SEQ ID NOs 1 a 8 están codificados por el genoma mitocondrial, su expresión está regulada por un mecanismo común, que usa al menos 3 ARNInc, preferentemente al menos 5 ARNInc, y más preferentemente todos los 8 ARNInc de SEQ ID NOs 1 a 8 pueden equilibrar diferencias potenciales asociadas a una sonda o método en
65 particular usados para detectar el nivel de expresión de una cualquiera de las SEQ ID NOs 1 a 8.

En el presente documento también se describe un kit para predecir la remodelación cardiaca después del infarto de miocardio en un paciente y/o predecir la mortalidad de un paciente con insuficiencia cardiaca crónica y/o predecir la insuficiencia cardiaca en un paciente, donde dicho kit comprende medios para la detección del nivel de expresión de uno o más ARNinc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8 e instrucciones para cómo usar el kit.

5 Los medios para la detección del nivel de expresión de uno o más ARNinc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8 son preferentemente los medios requeridos para (i) una PCR cuantitativa, preferentemente PCR cuantitativa en tiempo real, o (ii) un método de amplificación de molde/ARN seguido de determinación del nivel de expresión del uno o más ARNinc usando un método de cuantificación basado en fluorescencia o luminiscencia. Estos medios se han
10 detallado anteriormente de forma adicional en el presente documento, y pueden estar comprendidos en el kit. Por lo tanto, los medios comprenden preferentemente oligonucleótidos, tales como sondas o cebadores de hibridación fluorescentes, que se hibridan específicamente a uno o más ARNinc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8. Ingredientes adicionales de los kits pueden ser colorantes fluorescentes o luminiscentes, acoplados preferentemente a dichos oligonucleótidos. También, ingredientes adicionales de los kits pueden ser enzimas, tales como una
15 transcriptasa inversa y/o una polimerasa.

De acuerdo con el kit, los medios para la detección del nivel de expresión de uno o más ARNinc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8 preferentemente comprenden medios para detección del ARNinc de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2.

20 Los diversos componentes del kit se pueden envasar en uno o más recipientes tales como uno o más viales. Los viales pueden, además de los componentes, comprender conservantes o tampones para su almacenamiento. Además, el kit puede contener instrucciones para su uso.

25 Los medios pueden ser pares de cebadores usados para la detección específica del nivel de expresión de uno o más ARNinc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8.

En los ejemplos, se usaron pares de cebadores para la detección específica del nivel de expresión de los ARNinc de SEQ ID NO 1 a 8 (véase la Tabla 6). Los pares de cebadores comprenden preferentemente un par de cebadores
30 que se puede usar para la detección específica del nivel de expresión de los ARNinc de SEQ ID NO: 1. El par de cebadores que se puede usar para detección específica del nivel de expresión del ARNinc seleccionado de SEQ ID NO 1 se refleja preferentemente por las SEQ ID NOs 19 y 20.

Las figuras muestran:

35 **Figura 1:** Representación esquemática de flujo de trabajo de cribado y validación de ARNinc en diversas poblaciones con insuficiencia cardiaca. Se recogieron un total de 1526 muestras de 246 pacientes de la cohorte de REVE 2 (Fertin M *et al.*, Usefulness of serial assessment of B-type natriuretic peptide, troponin I, y C-reactive protein to predict left ventricular remodeling after acute myocardial infarction (del estudio de REVE-2). Am J
40 Cardiol. 2010; 106: 1410-1416); pacientes con un primer IM de ondas Q de la pared anterior cribados para remodelación del VI durante el periodo de 1 año después de IM y recogidas durante cuatro puntos temporales diferentes (valor inicial, después de uno, tres y 12 meses), 344 pacientes con insuficiencia cardiaca crónica, y 198 pacientes de un estudio de casos/control de pacientes con insuficiencia cardiaca crónica se usaron en el presente estudio. Este enfoque se identificó como *LIPCAR*, un ARN no codificante intergénico largo que predice la remodelación cardiaca y la supervivencia de pacientes con insuficiencia cardiaca. Los puntos de color rojo
45 indican los ARNinc regulados de forma significativa (> 2 veces; $p \leq 0,05$). Los puntos de color negro indican siete ARNinc mitocondriales regulados. La flecha de color negro indica *LIPCAR*.

50 **Figura 2:** Agrupación jerárquica basada en niveles ARNinc circulantes en pacientes con IC con (P1, P2, P3) o sin (P4, P5 P6) remodelación del ventrículo izquierdo (A). Representación de Volcán del factor de cambio y valores de p correspondientes para cada ARNinc después de la comparación de los dos grupos de pacientes (remodeladores con respecto a no remodeladores) (B).

55 **Figura 3:** La relación entre los ARNinc circulantes en el valor inicial y remodelación del VI. Los datos se proporcionan como Probabilidad Relativa (PR) y un intervalo de confianza de 95 % por 1 desviación típica. La remodelación del VI se define como un cambio de > 20 % en el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (VDFVI) a partir del valor inicial hasta 1 año de seguimiento. Los análisis se ajustaron en edad, sexo, y valor inicial de VDFVI.

60 **Figura 4:** Niveles de *LIPCAR* en el valor inicial, un mes, tres meses, y 12 meses después de IM de acuerdo con la presencia/ausencia de remodelación del VI. La remodelación del VI se definió como un cambio de > 20 % en VDFV a partir del valor inicial hasta 1 año de seguimiento. * $P < 0,01$ con respecto a no remodelación del VI, † $P < 0,05$ con respecto a no remodelación del LVVI

65 **Figura 5:** Niveles de *LIPCAR* en pacientes con etiología isquémica y no isquémica en la cohorte de IC crónica. El nivel de *LIPCAR* un año después de IM en pacientes con remodelación del VI significativa se muestra como una

referencia. *** P < 0,0001 con respecto a la remodelación del VI 1 después de IM.

Figura 6: Niveles de *LIPCAR* en pacientes con futura muerte cardiovascular con respecto a pacientes sin muerte cardiovascular en el estudio de casos/control. *** P < 0,0001 *con respecto a* Sin muerte cardiovascular.

5 **Figura 7:** Detección de siete ARNinc diferentes en plasma de tres controles sanos. El ARN se aisló de plasma recién preparado (0 h) así como de plasma mantenido a temperatura ambiente hasta 24 h y de plasma sometido a 4 ciclos de congelación/descongelación.

10 Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1 - Métodos

Poblaciones de pacientes con insuficiencia cardiaca

15 La estrategia del cribado y validación de ARNinc se representa en la Figura 1. Una asociación potencial entre los ARNinc detectables en EDTA-plasma y la presencia de futura remodelación del VI después de IM se analizó en la cohorte de REVE-2. Este estudio multicentro de prospección se diseñó para analizar la asociación entre biomarcadores circulantes y remodelación del VI (Fertin M *et al.*, Usefulness of serial assessment of B-type natriuretic peptide, troponin I, and C-reactive protein to predict left ventricular remodeling after acute myocardial infarction (del estudio de REVE-2). *Am J Cardiol.* 2010; 106: 1410-1416). 246 pacientes con un primer IM de ondas Q en la pared anterior se inscribieron de febrero de 2006 a septiembre de 2008. Los criterios de inclusión fueron hospitalización en 24 horas después del inicio de los síntomas y al menos tres segmentos del VI acinéticos en la zona del infarto en la ecografía realizada antes del alta. Los criterios de exclusión fueron una calidad de imagen ecográfica inadecuada, enfermedad no cardiaca limitante de vida, enfermedad valvular significativa, o un IM de ondas Q previo. El protocolo requirió estudios ecográficos en serie en el momento del alta hospitalaria (día tres a día siete) y tres, y 12 meses después del IM para evaluar la presencia de remodelación del VI, que se definió como un cambio de >20 % en el volumen diastólico final del VI (VDFVI) entre el valor inicial y un año. Las muestras de sangre se tomaron en serie en el momento del alta (día tres a día siete) y uno, tres, y 12 meses después del IM. El Comité Ético Institucional (Centro Hospitalario Universitario de Lille) aprobó el estudio; se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes. Para las características del paciente véase la Tabla 1.

La asociación entre los ARNinc seleccionados y características y pronósticos de IC se analizó a continuación en dos poblaciones de pacientes adicionales; estos pacientes fueron seleccionados de una serie consecutiva de pacientes con IC sistólica (fracción de eyección de VI (FEVI) \leq 45 %) dirigida por el Departamento de Cardiología en la Universidad de Lille. Los pacientes que eran ambulatorios y estaban clínicamente estables durante al menos dos meses se sometieron a toma de muestras de sangre para el estudio de biomarcadores de pronóstico. El Comité Ético Institucional (Centro Hospitalario Universitario de Lille) aprobó el estudio; se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes. El diseño de este estudio se ha publicado anteriormente con detalle (de Groot P *et al.*, B-type natriuretic peptide and peak exercise oxygen consumption provide independent information for risk stratification in patients with stable congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43: 1584-1589; y de Groot P *et al.*, Right ventricular systolic function for risk stratification in patients with stable left ventricular systolic dysfunction: comparison of radionuclide angiography to echoDoppler parameters. *Eur Heart J.* 2012; 33: 2672-2679). En primer lugar, se analizaron los niveles de ARNinc en 344 pacientes consecutivos incluidos desde enero de 2006 hasta mayo de 2010 (a los que se hace referencia como el cohorte de estudio de IC). Se realizó un seguimiento después de tres años para evaluar los resultados clínicos. Para las características del paciente véase la Tabla 2. El valor de pronóstico del ARNinc se evaluó adicionalmente en una población independiente de 198 pacientes incluidos entre noviembre de 1998 y diciembre de 2005 que se sometieron a una evaluación de pronóstico incluyendo una evaluación clínica, ecocardiografía, ensayos de ejercicio cardiopulmonar, y medición de BNP (referido al estudio de casos/control de IC). Se seleccionaron 99 pacientes que fallecieron de muerte cardiovascular en el plazo de tres años después de la valoración del pronóstico (casos); estos 99 pacientes se emparejaron (por edad, sexo y etiología de IC) con 99 pacientes de IC que estaban vivos después de tres años (controles). Para características del paciente véase la Tabla 3.

Aislamiento de ARN del plasma

55 Para cada paciente, se recogió plasma y se procedió tal como se ha descrito anteriormente (Bauters C *et al.*, Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013; 3 : 168: 1837-40). Así, se aisló ARN de 1526 muestras (246 del estudio de REVE 2 recogidas en cuatro puntos temporales diferentes, 344 a partir de la cohorte de IC sistólica y 198 del estudio de casos/control de IC sistólica) usando el Kit miRNeasy 96 (Qiagen, N.º 217061). Como control spiked-in, se añadió cel-miR-39 de *Caenorhabditis elegans* durante el proceso de aislamiento. La calidad y la integridad del ARN aislado se verificó con NanoDrop (Thermo scientific) y Bioanalyzer (Agilent). La proporción de DO260/280 variaba entre 1,68 y 1,8 y los índices de RIN variaron entre 7,1 y 7,8.

Análisis de micromatriz de los ARNInc

Para la identificación sistemática inicial del ARNInc, se aisló plasma ARN de 15 pacientes de sexo masculino a partir de la cohorte de REVE2 mostrando una remodelación del VI significativa 12 meses después del infarto de miocardio y 15 pacientes de sexo masculino sin remodelación del VI (tal como se ha definido anteriormente). Se obtuvieron seis muestras de ARN de los 30 pacientes mediante combinación del ARN de cinco pacientes dentro de un grupo como 'una muestra'. Por lo tanto, se generaron tres muestras de ARN combinadas de 15 pacientes con remodelación del VI y tres de pacientes sin remodelación del VI. Estas combinaciones se sometieron a análisis basado en micromatrices de transcriptoma global. En primer lugar, el ARN se amplificó previamente y a continuación se sometió a micromatrices (matriz de ARNInc Humano Arraystar; versión 2.0), que permiten la detección simultánea de 33.045 ARNInc. Para definir un buen ARNInc candidato biomarcador potencial, se eligió la siguiente estrategia: en primer lugar, todas los transcritos de ARNInc que se incluyeron en las micromatrices se clasificaron de acuerdo con su intensidad de señal media. La intensidad de la señal para cada transcrito de ARNInc varió entre cinco (valor más bajo) y 17 (valor más elevado). Solo de un 1,3 a un 4,3 % de todas los transcritos de ARNInc que se expresan a partir de los cromosomas somáticos y sexuales mostraban una intensidad de la señal > 9 en plasma (Tabla 5). A continuación, la detección del ARNInc se validó mediante PCR en tiempo real. Para este fin, el ARN aislado se transcribió de forma inversa con cebadores aleatorios (ARNInc). ARNInc específicos fueron amplificados usando los cebadores que se indican en la Tabla 6 y que corresponden a las SEQ ID NOs 9 a 22. El miR-39 de *C. elegans* se amplificó usando un ensayo TaqMan como un control de normalización.

20 Ensayos de estabilidad de ARNInc

La detección estable de siete ARNInc diferentes en plasma de tres controles sanos, fue sometida a ensayo. Esto incluyó el ensayo de detección del ARNInc en plasma directamente después de la extracción de sangre y manteniendo el plasma a temperatura ambiente durante 4 h, 8 h y 24 h. Además, se sometió a ensayo la influencia de cuatro ciclos repetitivos de congelación/descongelación en la expresión del ARNInc. En general como en todas las muestras, los siete ARNInc investigados se pudieron detectar de forma estable sin efectos de mantenimiento a temperatura ambiente o ciclos repetitivos de congelación/descongelación (Figura 7).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron usando la versión 3.0 del Paquete R Statistical. Los resultados se presentan como la media \pm DT o número (porcentajes) de pacientes. En todos los análisis estadísticos, los niveles de ARNInc se transformaron de forma logarítmica tomando el logaritmo en base dos para representar el sesgo de sus distribuciones. Las variables continuas se compararon usando el ensayo *t* de Student no emparejados. Las variables discretas se compararon usando un análisis χ^2 . Un valor *p* < 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Se usó regresión logística de múltiples variables para calcular probabilidades relativas (PR) y los correspondientes intervalos de confianza de un 95 %. Las PR se informaron para un aumento de la desviación estándar. Las asociaciones de los niveles del valor inicial de los 7 ARNInc candidatos con remodelación del VI en el estudio de REVE-2 se evaluaron usando una regresión logística ajustada por edad, sexo, y VDFVI en el valor inicial. En ambas poblaciones de IC, la muerte cardiovascular se definió como muerte a partir de causas cardiovasculares, trasplantes urgentes (definidos como estado uno de United Network for Organ Sharing), o implante de dispositivo de ayuda para el ventrículo izquierdo urgente. La asociación del ARNInc seleccionado con el riesgo de muerte cardiovascular se evaluó usando una regresión logística a ajustada por edad, sexo, de etiología isquémica, y diabetes. En el estudio del control de casos, el valor del pronóstico independiente del ARNInc seleccionados se evaluó mediante una regresión logística ajustada por edad, sexo, etiología isquémica, diabetes, clase de NYHA, VDFVI, BNP, y consumo máximo de oxígeno durante el ejercicio (VO₂ Máximo). Para ilustrar el impacto del pronóstico del ARNInc seleccionado en pacientes con IC, sus niveles se clasificaron en cuartiles.

Ejemplo 2- ARNInc circulantes para predecir afecciones cardiacas

50 Los niveles de los ARNInc circulantes se alteran durante el estadio inicial de la remodelación del VI después del IM

Las matrices de ARNInc se realizaron a partir de ARN obtenido a partir de plasma de pacientes incluidos en el estudio de remodelación del VI (Figura 1). Las características de los 246 pacientes incluidos en este estudio se resumen en la Tabla 1. Un seguimiento ecocardiográfico durante un año se completó para 226 (92 %) pacientes. La remodelación del VI, definida como un cambio > 20 % en VDFVI entre el valor inicial y 12 meses, se produjo en 87 (38,5 %) pacientes. A partir de esta población, se seleccionaron 15 pacientes de sexo masculino con remodelación del VI elevada (cambio en VDFVI= 73 ± 19 %) y 15 pacientes de sexo masculino sin remodelación del VI (cambio en VDFVI= -10 ± 10 %) con el mismo valor inicial de VDFVI en el momento del alta (remodeladores elevados: 49 ± 11 ml/m² con respecto a 49 ± 12 ml/m² en no remodeladores). En un intento para estudiar las alteraciones en los ARNInc circulantes en el estadio inicial de la remodelación del VI después del IM, se realizaron micromatrices en ARN de plasma de estos 30 pacientes en el valor inicial.

El análisis de agrupamiento jerárquico distinguió claramente los dos grupos de pacientes basándose en una firma específica de ARNInc circulantes detectables y significativamente regulados (Figura 2A). Un total de 768 transcritos

de ARNInc estaban desregulados específicamente (550 transcritos de ARNInc regulados de forma positiva y 218 transcritos de ARNInc regulados de forma negativa; cada una $p < 0,05$) en pacientes que desarrollarán remodelación del VI (Figura 2B). La filtración de todos los transcritos desregulados con intensidad de señal elevada (≥ 9) y al menos una desregulación de al menos 3 veces proporcionó 15 candidatos de ARNInc, de los cuales 7 se pudieron amplificar de forma coherente en todas las muestras individuales que se usaron en micromatrices. Cuando la abundancia de todos los ARNInc detectables se correlacionó con sus orígenes cromosómicos, el porcentaje más elevado (77,78 %) de los ARNInc con alta abundancia (intensidad de la señal > 9) era originado a partir del genoma mitocondrial (cromosoma M) (en comparación con un 1,3 a un 4,3 % para cromosomas somáticos y sexuales). Por lo tanto, la mayoría de los ARNInc mitocondriales estaba presente de manera abundante en el plasma (Tabla 5). De forma interesante, los siete ARNInc que se pudieron amplificar de forma coherente en todas las muestras individuales se originan a partir del genoma mitocondrial y todos estos ARNInc estaban desregulados negativamente de forma significativa ($p < 0,05$) en el análisis de micromatriz inicial. El nivel de expresión de estos siete ARNInc candidatos a continuación se evaluó mediante PCR en tiempo real independiente en toda la población del estudio de 246 pacientes en el valor inicial. Los niveles de estos siete ARNInc se correlacionaron de forma positiva entre sí (Tabla 7). Al realizar la validación en la cohorte total, solamente uc022bqs.1 (SEQ ID NO: 1) y uc004cos.4 (SEQ ID NO: 2) de los ARNInc estaban regulados de forma significativamente negativa y predecían una futura remodelación cardíaca en pacientes (OR de 0,69 [0,49-0,94] ($P = 0,022$), y 0,62 [0,44-0,86] ($P = 0,005$), respectivamente; Figura 3). Dado que ambos valores de los ARNInc estaban correlacionados de forma positiva (Tabla 7), para análisis adicionales se seleccionó uc022bqs.1 (que tenía la asociación más elevada con la remodelación del VI). Debido a sus propiedades, este ARNInc se denomina *LIPCAR* (SEQ ID NO: 1) en secciones posteriores del manuscrito (ARN no codificante Largo Intergénico que Predice Remodelación Cardíaca).

Los niveles de *LIPCAR* aumentan durante las etapas tardías de la remodelación después del IM

A continuación, el nivel de *LIPCAR* se estudió longitudinalmente en muestras de plasma obtenidas uno, tres y 12 meses después del IM en los pacientes de la cohorte de REVE-2. En la población general del estudio, se produjo un aumento de los niveles de *LIPCAR* durante el período de seguimiento de un año. De forma importante, como se ilustra en la Figura 4, cuando se evalúan a uno, 3 y 12 meses, los niveles de *LIPCAR* eran significativamente más elevados en pacientes que desarrollaron remodelación del VI. Por lo tanto, en pacientes con remodelación del VI, los niveles circulantes de *LIPCAR* se regulan de forma negativa en el valor inicial, pero se regulan de forma positiva significativamente durante el desarrollo de la insuficiencia cardíaca (IC).

Los niveles de *LIPCAR* son elevados en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica

Dado que *LIPCAR* estaba regulado de forma positiva en los estadios terminales de pacientes que desarrollan remodelación del VI después del IM, se planteó la hipótesis de que sus niveles circulantes también podían ser elevados en pacientes con IC crónica. Esta hipótesis se sometió ensayo en otra cohorte independiente de 344 pacientes con IC sistólica (véase la Tabla 2 para características del paciente). Estos pacientes presentaban características de edad y sexo similares en comparación con los pacientes del estudio de remodelación del VI; también recibieron inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y beta-bloqueadores en la mayoría de los casos. La IC era de etiología isquémica en aproximadamente la mitad de los casos. Estos pacientes presentaban una enfermedad más avanzada que los pacientes del estudio de remodelación del VI como se muestra por su fracción de eyección del VI más baja. Como se ilustra en la Figura 5, los niveles de *LIPCAR* eran incluso más elevados en IC crónica que en pacientes con remodelación del VI en desarrollo un año después del IM; esto no solamente era evidente para los pacientes con IC isquémica sino también para los pacientes con IC no isquémica (ambos $P < 0,0001$ con respecto a pacientes con remodelación del VI un año después del IM). A continuación, se estudió si los niveles de *LIPCAR* estaban asociados con el riesgo de futuros sucesos cardiovasculares en pacientes con IC crónica. Durante un seguimiento clínico de tres años, 39 pacientes con IC con mediciones de *LIPCAR* en el momento de la inclusión murieron por causas cardiovasculares, mientras que 254 todavía están vivos después de los tres años. Los niveles de *LIPCAR* en el momento de la inclusión estaban asociados de forma significativa con el riesgo de muerte cardiovascular (OR (ajustado por edad, sexo, etiología isquémica, y diabetes mellitus) = 1,42 [1,02-2,01], $P = 0,04$).

LIPCAR como un indicador de pronóstico para IC crónica

Dado que la observación de que los niveles de *LIPCAR* elevados pueden ser asociados a una futura muerte cardiovascular se obtuvo a partir de una población con un número limitado de sucesos, el valor de pronóstico de este biomarcador potencial se estudió adicionalmente en una tercera población de pacientes con IC sistólica crónica. Como se ha explicado anteriormente, este era un estudio de control de casos en el que los pacientes de ensayo murieron a partir de muerte cardiovascular en el plazo de tres años desde la evaluación del pronóstico, mientras que los controles todavía estaban vivos tres años después. Como se muestra en la Tabla 3, los pacientes de ensayo presentaban una clase elevada de NYHA y niveles de BNP más elevados, y VO_2 Máximo más bajo. Como se muestra en la Figura 6, los niveles de *LIPCAR* en el momento de la evaluación del pronóstico era más elevados en los pacientes de ensayo que en los pacientes de control ($P < 0,0001$). En comparación con los pacientes del primer cuartil para niveles de *LIPCAR*, los pacientes en el tercer y cuarto cuartiles habían aumentado la mortalidad cardiovascular (OR = 6,58 [2,76-16,67], y 13,23 [5,19-36,8], respectivamente, ambos con $P < 0,0001$) (Tabla 4). En

5 un modelo ajustado para edad, sexo, etiología isquémica, diabetes mellitus, clase de NYHA, VFVI, BNP, y VO₂ Máximo, el nivel de *LIPCAR* usado como una variable continua era un indicador independiente de mortalidad cardiovascular en tres años con una OR de 4,16 [2,67-6,90] (P < 0,0001); se obtuvieron resultados similares cuando los niveles de *LIPCAR* se clasificaron en cuartiles (tercer con respecto al primer cuartil, OR = 17,12 [5,19-66,61] (P < 0,0001); cuarto *con respecto a* primer cuartil, OR = 32,58 [9,62-131,00] (P < 0,0001).

Tabla 1. Características de los pacientes incluidos en el estudio de remodelación de IV (n = 246)

Edad (años ± DT)	57 ± 14
Mujeres	46 (19 %)
Diabetes mellitus	51 (21 %)
Primer infarto de miocardio anterior	246 (100 %)
Terapia de reperfusión inicial:	
- Intervención coronaria percutánea primaria	128 (52 %)
- Trombólisis sola	28 (11 %)
- Trombólisis e intervención coronaria percutánea de rescate	59 (24 %)
- Sin reperfusión	31 (13 %)
Creatina quinasa máxima (IU ± DT)	3018 ± 2376
IC (clase de Killip ≥ 2) durante su hospitalización	79 (32 %)
FEVI (% ± DT)	49 ± 8
Medicaciones en el momento de la alta:	
- Terapia antiplaquetaria	246 (100 %)
- Beta-bloqueadores	238 (97 %)
- Inhibidores de ACE	238 (97 %)
- Estatinas	231 (94 %)
Seguimiento ecocardiográfico de un año:	
- Número de pacientes con seguimiento	226 (92 %)
- Cambio en VDFVI entre el valor inicial y 1 año (% ± DT)	21 ± 27
- Remodelación de VI ⁽¹⁾	87 (38,5 % ⁽²⁾)

VI indica ventrículo izquierdo; DT, desviación típica; IU, unidades internacionales; FE, fracción de eyección; ACE, enzima convertidora de angiotensina; VDF, volumen diastólico final.

⁽¹⁾ definido como un cambio >20 % en VDFVI entre el valor inicial y 12 meses.

⁽²⁾ número de pacientes entre 226 pacientes con seguimiento ecocardiográfico.

Tabla 2. Características de los pacientes incluidos en el estudio de cohorte de IC

	HF isquémica (n = 164)	HF no isquémica (n = 180)
Edad (años ± DT)	56 ± 11	53 ± 11
Mujeres	28 (17 %)	41 (23 %)
Diabetes mellitus	50 (30 %)	37 (21 %)
Clase de NYHA:		
1 / 2	136 (83 %)	153 (85 %)
3	28 (17 %)	27 (15 %)
FEVI (% ± DT)	33 ± 9	34 ± 10
Inhibidores de ACE	130 (79 %)	148 (82 %)
Beta-bloqueadores	159 (97 %)	166 (92 %)
Diuréticos	123 (75 %)	145 (81 %)

NYHA indica New York Heart Association; FEVI, fracción de eyección de ventrículo izquierdo; ACE, enzima convertidora de angiotensina

Tabla 3. Características de los pacientes incluidos en el estudio de caso/control de IC sistólica

	Muerte no cardiovascular (n = 99)	Muerte cardiovascular (n = 99)	Valor P
Edad (años ± DT)	59611	59611	-
Mujeres	8 (8 %)	8 (8 %)	-
Etiología de IC:			
- Isquémica	58 (59 %)	58 (59 %)	-
- No isquémica	41 (41 %)	41 (41 %)	-
Diabetes mellitus	33 (33 %)	34 (34 %)	0,901
clase de NYHA:			
- 1 o 2	81 (82 %)	63 (64 %)	0,004
- 3	18 (18 %)	36 (36 %)	0,004
FEVI (% ± DT)	29 ± 9	28610	0,490
VO ₂ Máximo (ml/min/kg ± DT)	17,2 ± 4,9	13,5 ± 3,7	< 0,0001
BNP			
- Bajo	40 (42 %)	17 (18 %)	
- Intermedio	33 (34 %)	43 (45 %)	0,002
- Elevado	23 (24 %)	35 (37 %)	
Inhibidores de ACE	92 (93 %)	92 (93 %)	1
Beta-bloqueadores	94 (95 %)	90 (91 %)	0,407
diuréticos	77 (78 %)	87 (88 %)	0,06

NYHA indica New York Heart Association; FEVI, fracción de eyección del ventrículo izquierdo; VO₂ máximo, consumo máximo de oxígeno en ejercicio; BNP, péptido natriurético de tipo B; ACE, enzima convertidora de angiotensina. Los niveles de BNP se clasificaron como bajos (deciles 1, 2, y 3), intermedios (deciles 4, 5, 6, y 7), Y elevados (deciles 8, 9, y 10)

Tabla 4. Asociación de niveles de LIPCAR con mortalidad cardiovascular en el estudio de caso/control de sistólica (n = 198 pacientes)

	Oportunidad Relativa	95 % de CI	valor P
LIPCAR (log2), por 1 DT	3,18	2,24-4,67	< 0,0001
LIPCAR (cuartiles de unidades arbitrarias)			
0-0,102	-	-	-
0,102-0,18	1,24	0,5-3,11	0,6
0,18-2,56	6,58	2,76-16,67	< 0,0001
2,56-89,5	13,23	5,19-36,8	< 0,0001

Ajustado en edad, género, etiología de IC, y diabetes mellitus; CI indica intervalo de confianza

Tabla 5. ARNinc detectados con intensidad de señal media ≥ 9 en las 6 micromatrices.

Cr. N.º	ARNinc Total representado	ARNinc con intensidad de señal ≥ 9	%
1	2139	37	1,73
2	1553	36	2,32
3	1077	23	2,14
4	779	16	2,05
5	1074	35	3,26
6	984	16	1,63
7	1049	33	3,15
8	870	19	2,18
9	765	21	2,75
10	980	15	1,53
11	1414	28	1,98
12	1105	26	2,35
13	470	14	2,98
14	686	17	2,48
15	972	26	2,67
16	1028	25	2,43
17	1263	35	2,77
18	353	7	1,98
19	469	6	1,28
20	660	9	1,36
21	299	13	4,35
22	546	14	2,56
m	9	7	77,78
x	451	12	2,66
y	294	2	0,68

m = genoma mitocondrial; x/y = cromosomas sexuales

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos usadas para detección de ARNinc

ARNinc	Cebador directo	Cebador inverso
uc004cos.4	ATGGCCAACCTCCTACTCCT	TAGATGTGGCGGGTTTTAGG
uc004coz.1	CAAATCCCTTCTCGTCCCCA	TACCCCAAGTGTTATGGGC
uc004cov.4	TTCCCAACCTTTTCCTCCG	TGGATAAGTGGCGTTGGCTT
uc011mfi.2	ACCGGGGGTATACTACGGTC	GCTCTAGAGGGGGTAGAGGG
uc022bqw.1	TATCGCCATCCCATAACATT	GGTGATTCCTAGGGGGTTGT
uc022bqs.1	TAAAGGATGCGTAGGGATGG	TTCATGATCACGCCCTCATA
uc022bqu.1	GCGGCTTCGACCCTATATCC	AGGGCTCATGGTAGGGGTAA

Tabla 7. Coeficientes de correlación para siete ARNinc

	uc004cos.4	uc004coz.1	uc004cov.4	uc011mfi.2	uc022bqw.1	uc022bqs.1
uc004coz.1	0,88					
uc004cov.4	0,64	0,83				
uc011mfi.2	0,61	0,77	0,84			
uc022bqw.1	0,55	0,55	0,38	0,63		
uc022bqs.1	0,62	0,58	0,38	0,60	0,96	
uc022bqu.1	0,60	0,78	0,92	0,88	0,56	0,52

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Medizinische Hochschule Hannover et al.

10 <120> ARNs no codificantes mitocondriales para predecir la progresión de la enfermedad en pacientes con insuficiencia cardiaca e infarto de miocardio

<130> X1162 EP

15 <140> EP 15 71 0513.1
<141> 18-03-2015

<150> EP 14 16 0577.4
<151> 18-03-2014

20 <160> 22

<170> BiSSAP 1.2

25 <210> 1
<211> 781
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<221> origen
<222> 1 ..781
<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="UC022BQS.1 " /organismo="*Homo sapiens*"

35 <400> 1

ES 2 715 528 T3

aggcccattt gagtattttg ttttcaatta gggagatagt tggattagg attaggattg 60
 ttgtgaagta tagtacggat gctacttgtc caatgatggt aaaagggtag cttactgggt 120
 gtcctccgat tcaggttaga atgaggaggt ctgctggctag gagtcaataa agtgattggc 180
 ttagtgggcg aaatattatg ctttgttgtt tggatatatg gaggatgggg attattgcta 240
 ggatgaggat ggatagtaat agggcaagga cgcctcctag tttgttaggg acggatcggg 300
 gaattgtgta ggcgaatagg aaatatcatt cgggcttgat gtggggaggg gtgtttaagg 360
 ggttggctag ggtataattg tctgggtcgc ctggttctag gaataatggg ggaagtatgt 420
 aggagttgaa gattagtccg ccgtagtcgg tgtactcgtg ggttcagtac cattggtggc 480
 caattgattt gatggtaagg gagggatcgt tgacctcgtc tgttatgtaa aggatgcgta 540
 gggatgggag ggcgatgagg actaggatga tggcgggag gatagttcag acggtttcta 600
 tttcctgagc gtctgagatg ttagtattag ttagttttgt tgtgagtgtt aggaaaaggg 660
 catacaggac taggaagcag ataaggaaaa tgattatgag ggcgtgatca tgaaaggtga 720
 taagctcttc tatgataggg gaagtagcgt cttgtagacc tacttgcgct gcatgtgcca 780
 t 781

<210> 2
 <211> 2509
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> Origen
 <222> 1..2509
 <223> /mol_type="ADN no designado" /nota="UC004COS.4" /organismo="*Homo sapiens*"

10

<400> 2

ES 2 715 528 T3

gaaattgaaa cctggcgcaa tagatatagt accgcaaggg aaagatgaaa aattataacc	60
aagcataata tagcaaggac taaccctat accttctgca taatgaatta actagaaata	120
actttgcaag gagagccaaa gctaagacc cggaaaccag acgagctacc taagaacagc	180
taaaagagca caccctcta tgtagcaaaa tagtgggaag atttataggt agaggcgaca	240
aacctaccga gcctggtgat agctggttgt ccaagataga atcttagttc aactttaaat	300
ttgccacag aaccctctaa atccccttgt aaatttaact gttagtccaa agaggaacag	360
ctctttggac actaggaaaa aaccttgtag agagagtaaa aaatttaaca cccatagtag	420
gcctaaaagc agccaccaat taagaaagcg ttcaagctca acaccacta cctaaaaaat	480
cccaaacata taactgaact cctcacacc aattggacca atctatcacc ctatagaaga	540
actaatgta gtataagtaa catgaaaaca ttctcctccg cataagcctg cgtcagatca	600
aaactgaa ctgacaatta acagcccaat atctacaatc aaccaacaag tcattattac	660
cctcactgtc aaccacac aggcattgtc ataaggaaag gttaaaaaaaa gtaaaaggaa	720
ctcggcaaac cttacccgc ctgtttacca aaaacatcac ctctagcatc accagtatta	780
gaggcaccgc ctgcccagt acacatggtt aacggccgcg gtaccctaac cgtgcaaagg	840
tagcataatc acttgttcct taaatagggc cctgtatgaa tggctccacg agggttcagc	900
tgtctcttac ttttaaccag tgaaattgac ctgcccgtga agaggcgggc atgacacagc	960
aagacgagaa gaccctatgg agctttaatt tattaatgca aacagtacct aacaaacca	1020
caggtcctaa actaccaaac ctgcattaaa aatttcgggtt ggggcgacct cggagcagaa	1080
cccaacctcc gagcagtaca tgctaagact tcaccagtca aagcgaacta ctatactcaa	1140
ttgatccaat aacttgacca acggaacaag ttaccctagg gataacagcg caatcctatt	1200
ctagagtcca tatcaacaat agggtttacg acctcgatgt tggatcagga catcccgatg	1260
gtgcagccgc tattaaggt tcgtttggtc aacgattaaa gtcctacgtg atctgagttc	1320
agaccggagt aatccaggtc ggtttctatc tacttcaaat tcctccctgt acgaaaggac	1380
aagagaaata aggcctactt cacaaagcgc cttccccctg aatgatatc atctcaactt	1440
agtattatac ccacaccac ccaagaacag ggtttgtaa gatggcagag cccggtaatc	1500
gcataaaact taaaacttta cagtcagagg ttcaattcct cttcttaaca acatacccat	1560

ES 2 715 528 T3

ggccaacctc ctactcctca ttgtacccat tctaatacgca atggcattcc taatgottac 1620
 cgaacgaaaa attctaggct atatacaact acgcaaaggc cccaacgttg taggccccta 1680
 cgggctacta caacccttcg ctgacgccat aaaactcttc accaaagagc ccctaaaacc 1740
 cgccacatct accatcacc cctacatcac cgccccgacc ttagctctca ccatcgctct 1800
 tctactatga acccccctcc ccataccxaa ccccctggtc aacctcaacc taggcctcct 1860
 atttattcta gccacctcta gcctagccgt ttactcaatc ctctgatcag ggtgagcatc 1920
 aaactcaaac tacgccctga tcggcgact gcgagcagta gcccaaacia totcatatga 1980
 agtcacccta gccatcattc tactatcaac attactaata agtggctcct ttaacctctc 2040
 cacccttatt acaacacaag aacacctctg attactcctg ccatcatgac ccttggccat 2100
 aatatgattt atctccacac tagcagagac caaccgaacc cccttcgacc ttgccgaagg 2160
 ggagtccgaa ctagtctcag gcttcaacat cgaatacgcc gcaggcccct tcgccctatt 2220
 cttcatagcc gaatacacia acattattat aataaacacc ctcaccacta caatcttctc 2280
 aggaacaaca tatgacgcac tctcccctga actctacaca acatattttg tcaccaagac 2340
 cctacttcta acctccctgt tcttatgaat tcgaacagca taccocccgat tccgctacga 2400
 ccaactcata cacctcctat gaaaaaactt cctaccactc accctagcat tacttatatg 2460
 atatgtctcc ataccatta caatctccag cattccccct caaacctaa 2509

<210> 3
 <211> 1242
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> Origen
 <222> 1. .1242
 <223> /mol_type="ADN no designado" /nota="UC004COX.4 " /organismo="*Homo sapiens*"

10

<400> 3

ES 2 715 528 T3

ctacactcca actcatgaga cccacaacaa atagcccttc taaacgctaa tccaagcctc 60
 acccactac taggcctcct cctagcagca gcaggcaaat cagcccaatt aggtctccac 120
 ccctgactcc cctcagccat agaaggcccc accccagtct cagccctact ccaactcaagc 180
 actatagttg tagcaggaat cttcttactc atccgcttcc accccctagc agaaaatagc 240
 ccactaatcc aaactctaac actatgctta ggcgctatca ccactctggt cgcagcagtc 300
 tgcgccctta cacaaaatga catcaaaaaa atcgtagcct tctccacttc aagtcaacta 360
 ggactcataa tagttacaat cggcatcaac caaccacacc tagcattcct gcacatctgt 420
 acccacgcct tcttcaaagc catactatct atgtgctccg ggtccatcat ccacaacctt 480
 aacaatgaac aagatattcg aaaaatagga ggactactca aaaccatacc tctcacttca 540

 acctccctca ccattggcag cctagcatta gcaggaatac ctttcctcac aggtttctac 600
 tccaaagacc acatcatcga aaccgcaaac atatcataca caaacgcctg agccctatct 660
 attactctca tcgctacctc cctgacaagc gcctatagca ctggaataat tcttctcacc 720
 ctaacaggtc aacctcgctt cccaccctt actaacatta acgaaaataa cccacccta 780
 ctaaacccca ttaaagcctt ggcagccgga agcctattcg caggatttct cattaactaac 840
 aacatttccc ccgcatcccc cttccaaaca acaatcccc tctacctaaa actcacagcc 900
 ctcgctgtca ctttcctagg acttctaaca gcctagacc tcaactacct aaccaacaaa 960
 cttaaaataa aatccccact atgcacattt tatttctcca acatactcgg attctaccct 1020
 agcatcacac accgcacaat cccctatcta ggccttctta cgagccaaaa cctgccctta 1080
 ctctccttag acctaacctg actagaaaag ctattaccta aaacaatttc acagcaccaa 1140
 atctccacct ccatcatcac ctcaacccaa aaaggcataa ttaaacttta cttcctctct 1200
 ttcttcttcc cactcatcct aaccctactc ctaatcacat aa 1242

<210> 4
 <211> 1666
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> Origen
 <222> 1. .1666
 <223> /mol_type="ADN no designado" /nota="UC004COV.4" /organismo="*Homo sapiens*"

10

<400> 4

ES 2 715 528 T3

gccctcatt tacataaata ttatactagc atttaccatc tcacttctag gaatactagt 60
 atatcgctca cacctcatat cctccctact atgcctagaa ggaataatac tatcgctggt 120
 cattatagct actctcataa ccctcaacac ccaactccctc ttagccaata ttgtgcctat 180
 tgccatacta gtctttgccg cctgcgaagc agcgggtgggc ctagccctac tagtctcaat 240
 ctccaacaca tatggcctag actacgtaca taacctaaac ctactccaat gctaaaacta 300
 atcgtcccaa caattatatt actaccactg acatgacttt ccaaaaagca cataatttga 360
 atcaacacaa ccaccacag cctaattatt agcatcatcc ccctactatt ttttaaccaa 420
 atcaacaaca acctatthag ctgttcccca accttttctc cggaccccct aacaaccccc 480
 ctctaatac taactacctg actcctacc ctcacaatca tggcaagcca acgccactta 540
 tccagcgaac cactatcacg aaaaaaactc tacctctcta tactaatctc cctacaaatc 600
 tccttaatta taacattcac agccacagaa ctaatcatat tttatatctt cttcgaaacc 660
 acacttatcc ccaccttggc tatcatcacc cgatgaggca accagccaga acgcctgaac 720
 gcaggcacat acttcctatt ctacacccta gtaggctccc ttcccctact catcgacta 780
 atttactctc acaacaccct aggctcacta aacattctac tactcactct cactgcccaa 840
 gaactatcaa actcctgagc caacaactta atatgactag cttacacaat agcttttata 900
 gtaaagatac ctctttacgg actccactta tgactcccta aagcccattgt cgaagcccc 960
 atcgctgggt caatagtact tgccgcagta ctcttaaaac taggcggcta tgggtataata 1020
 cgcctcacac tcattctcaa ccccctgaca aaacacatag cctaccctt ccttgtacta 1080
 tccctatgag gcataattat aacaagctcc atctgcctac gacaaacaga cctaaaatcg 1140
 ctcatgcat actcttcaat cagccacata gccctcgtag taacagccat tctcatcaa 1200
 accccctgaa gcttcaccgg cgcagtcatt ctcataatcg cccacggact cacatcctca 1260
 ttactattct gcctagcaaa ctcaaactac gaacgcactc acagtcgcat cataatcctc 1320
 tctcaaggac ttcaaactct actcccacta atagcttttt gatgacttct agcaagcctc 1380
 gctaacctcg ccttaccctc cactattaac ctactgggag aactctctgt gctagtaacc 1440
 acgttctcct gatcaaatat cactctccta cttacaggac tcaacatact agtcacagcc 1500
 ctatactccc tctacatatt taccacaaca caatggggct cactcaccca ccacattaac 1560
 aacataaaac cctcattcac acgagaaaac accctcatgt tcatacacct atccccatt 1620
 ctctcctat ccctcaacc cgcacatcatt accgggtttt cctctt 1666

<210> 5
 <211> 1032
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 715 528 T3

<220>
 <221> Origen
 <222> 1. .1032
 <223> /mol_type="ADN no designado" /nota="UC022BQW.1 " /organismo="Homo sapiens"

5

<400>5

ttggcgctg cctgacctc caaatcacca caggactatt cctagccata cactactcac	60
cagacgcctc aaccgccttt tcatcaatcg cccacatcac tcgagacgta aattatggct	120
gaatcatccg ctacctcac gccaatggcg cctcaatatt ctttatctgc ctcttctac	180
acatcggggc aggcctatat tacggatcat ttctctactc agaaacctga aacatcggca	240
ttatcctcct gcttgcaact atagcaacag cttcatagg ctatgtcctc ccgtgaggcc	300
aaatatcatt ctgaggggcc acagtaatta caaacttact atccgccatc ccatacattg	360
ggacagacct agttcaatga atctgaggag gctactcagt agacagtccc accctcacac	420
gattctttac ctttcacttc atcttaccct tcattattgc agccctagca gcactccacc	480
tcctattctt gcacgaaacg ggatcaaaca acccctagg aatcacctcc cattccgata	540
aaatcacctt ccacccttac tacacaatca aagacgcctt cggcttactt ctcttcttc	600
tctccttaat gacattaaca ctattctcac cagacctcct aggcgacca gacaattata	660
ccctagccaa ccccttaaac acccctcccc acatcaagcc cgaatgatat ttctattcg	720
cctacacaat tctccgatcc gtccttaaca aactaggagg cgtccttgcc ctattactat	780
ccatcctcat cctagcaata atccccatcc tccatatatc caaacaacaa agcataatat	840
ttcgcccact aagccaatca ctttattgac tcctagccgc agacctcctc attotaacct	900
gaatcggagg acaaccagta agctaccctt ttaccatcat tggacaagta gcatccgtac	960
tatacttcac aacaatccta atcctaatac caactatctc cctaattgaa aacaaaatac	1020
tcaaatgggc ct	1032

10 <210> 6
 <211> 573
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <221> Origen
 <222> 1..573
 <223> /mol_type="ADN no designado" /nota="UC004COZ.1 " /organismo="Homo sapiens"

20 <400> 6

ES 2 715 528 T3

```

aagattctaa tttaaactat tctctgttct ttcattggga agcagatttg ggtaccaccc      60
aagtattgac tcacccatca acaaccgcta tgtatttcgt acattactgc cagccacccat     120
gaatattgta cgttaccata aatattgac cacctgtagt acataaaaac ccaaccacaca     180
tcaaaccccc ccccccatg cttacaagca agtacagcaa tcaaccttca actatcacac     240
atcaactgca actccaaagc caccctcac ccactaggat accaacaac ctaccaccc      300
ttaacagtac atagtacata aagtcattta ccgtacatag cacattacag tcaaattcct     360
tctcgtcccc atggatgacc ccctcagat aggggtccct tgaccacccat cctccgtgaa     420
atcaatatcc cgcacaagag tgctactctc ctcgctccgg gcccataaca cttgggggta     480
gctaaagtga actgtatccg acatctgggt cctacttcag ggccataaag cctaaatagc     540
ccacacgttc cccttaaata agacatcagc atg                                     573

```

<210> 7
 <211> 1622
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> Origen
 <222> 1. .1622
 <223> /mol_type="ADN no designado" /nota="UC011MFI.2 " /organismo-'*Homo sapiens*'

10

<400> 7

ES 2 715 528 T3

atggcacatg cagcgcaagt aggtctacaa gacgctactt cccctatcat agaagagctt 60
atcacctttc atgatcacgc cctcataatc attttcctta tctgcttcct agtcctgtat 120
gcccttttcc taacactcac aacaaaacta actaatacta acatctcaga cgctcaggaa 180
atagaaaccg tctgaactat cctgcccgcc atcatcctag tcctcatcgc cctcccatcc 240
ctacgcatcc ttacataac agacgaggtc aacgatccct cccttaccat caaatcaatt 300
ggccaccaat ggtactgaac ctacgagtac accgactacg ggggactaat cttcaactcc 360
tacatacttc ccccattatt cctagaacca ggcgacctgc gactccttga cgttgacaat 420
cgagtagtac tcccgattga agccccatt cgtataataa ttacatcaca agacgtcttg 480
cactcatgag ctgtccccac attaggctta aaaacagatg caattcccgg acgtctaaac 540
caaaccactt tcaccgctac acgaccgggg gtatactacg gtcaatgctc tgaaatctgt 600
ggagcaaacc acagtttcat gcccatcgtc ctagaattaa ttcccctaaa aatctttgaa 660
atagggcccc tatttaccct atagcacccc ctctaccccc tctagagccc actgtaaagc 720
taacttagca ttaacctttt aagttaaaga ttaagagaac caacacctct ttacagtgaa 780
atgcccacac taaatactac cgtatggccc accataatta cccccatact ccttacacta 840
ttcctcatca cccaactaaa aatattaaac acaactacc acctacctcc ctcaccaaag 900
cccataaaaa taaaaaatta taacaaacc tgagaaccaa aatgaacgaa aatctgttcg 960
cttcattcat tgccccaca atcctaggcc taccgcccgc agtactgatc attctatttc 1020
cccctctatt gatccccacc tccaaatatc tcatcaaca cggactaatc accacccaac 1080
aatgactaat caaactaacc tcaaaacaaa tgatagccat acacaacact aaaggacgaa 1140
cctgatctct tatactagta tccttaatca tttttattgc cacaaactaac ctccctcggac 1200
tcctgcctca ctcatctaca ccaaccacc aactatctat aaacctagcc atggccatcc 1260
ccttatgagc gggcgcagtg attataggct ttcgctctaa gattaaaaat gccctagccc 1320
acttcttacc acaaggcaca cctacacccc ttatccccat actagttatt atcgaaacca 1380
tcagcctact cattcaacca atagccctgg ccgtacgcct aaccgctaac attactgcag 1440
gccacctact catgcaccta attggaagcg ccaccctagc aatatcaacc attaaccttc 1500
cctctacact tatcatcttc acaattctaa ttctactgac tatectagaa atcgctgtcg 1560
ccttaatcca agcctacggt ttcacacttc tagtaagcct ctacctgcac gacaacacat 1620
aa 1622

<210> 8
<211> 346
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 715 528 T3

<220>
 <221> Origen
 <222> 1..346
 <223> /molType='ADN no designado' /nota='UC022BQU.1' /organismo='Homo sapiens'
 5
 <400> 8

 ataaacttcg ccttaatttt aataatcaac accctcctag ccttactact aataattatt 60
 acattttgac taccacaact caacggctac atagaaaaat ccaccctta cgagtgcggc 120
 ttcgacccta tatccccgc ccgcgtccct ttctccataa aattcttctt agtagctatt 180
 accttcttat tatttgatct agaaattgcc ctctctttac ccctaccatg agccctacaa 240
 acaactaacc tgccactaat agttatgtca tccctcttat taatcatcat cctagcccta 300
 agtctggcct atgagtgact acaaaaagga ttagactgaa ccgaat 346

 10 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <221> Origen
 <222> 1..20
 <223> /mol_type='ADN no designado' /nota='uc004cos.4 cebador sentido' /organismo='Secuencia artificial'

 20 <400> 9
 atggccaacc tcctactct 20

 <210> 10
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> Origen
 30 <222> 1..20
 <223> /mol_type='ADN no designado' /nota='uc004cos.4 cebador antisentido' /organismo='Secuencia artificial'

 <400> 10
 tagatgtggc gggtttagg 20
 35
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> Origen
 <222> 1..20
 <223> /mol_type='ADN no designado' /nota='uc004coz.1 cebador sentido' /organismo='Secuencia artificial'
 45
 <400> 11
 caaatccctt ctgctcccca 20

 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>

ES 2 715 528 T3

<221> Origen
<222> 1..20
<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="uc004coz.1 cebador antisentido" /organismo-"Secuencia artificial"

5 <400> 12
taccccaag tggatgggc 20

<210> 13
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Origen
15 <222> 1..20
<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="uc004cov.4 cebador sentido" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 13
20 ttcccaacc tttctcctcg 20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Origen
30 <222> 1..20
<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="uc004cov.4 cebador antisentido" /organismo-"Secuencia artificial"

<400> 14
tggataagtg gcgtaggctt 20

<210> 15
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Origen
40 <222> 1..20
<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="uc011mfi.2 cebador sentido" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 15
45 accgggggta tactacggtc 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Origen
55 <222> 1..20
<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="uc011mfi.2 cebador antisentido" /organismo-"Secuencia artificial"

<400> 16
gctctagagg gggtagaggg 20

<210> 17
<211> 20
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 715 528 T3

5 <220>
<221> Origen
<222> 1..20
<223> /mol_type='ADN no designado' /nota='uc022bqw.1 cebador sentido' /organismo='Secuencia artificial'

<400> 17
tatccgcat cccatacatt 20

10 <210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> Origen
<222> 1..20
<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="uc022bqw.1 cebador antisentido" /organismo="Secuencia artificial"

20 <400> 18
ggtgattcct agggggtgt 20

25 <210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> Origen
<222> 1..20
<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="uc022bqs.1 cebador sentido" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 19
taaaggatgc gtagggatgg 20

35 <210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> Origen
<222> 1..20
<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="uc022bqs.1 cebador antisentido" /organismo="Secuencia artificial"

45 <400> 20
ttcatgatca cgccctcata 20

50 <210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> Origen
<222> 1..20
<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="uc022bqu.1 cebador sentido" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 21

60 gcggtctega ccctatatcc 20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN

ES 2 715 528 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Origen

5 <222> 1..20

<223> /mol_type="ADN no designado" /nota="uc022bqu.1 cebador antisentido" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 22

10 agggctcatg gtagggtaa 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la mortalidad de un paciente de ensayo con insuficiencia cardiaca crónica que comprende

- 5 (a) detectar el nivel de expresión de uno o más ARN no codificantes largos (ARNlnc) seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8, en el que el uno o más ARNlnc es/son o comprende(n) el(los) ARNlnc de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 en una muestra obtenida a partir de dicho paciente de ensayo con insuficiencia cardiaca crónica,
- 10 (b) comparar dicho nivel de expresión del uno o más ARNlnc con el nivel de expresión de estos uno o más ARNlnc en una muestra obtenida a partir de pacientes de control con insuficiencia cardiaca crónica, en el que los pacientes de control estaban vivos al menos aproximadamente tres años después del diagnóstico de la insuficiencia cardiaca crónica, y una sobreexpresión de al menos uno del uno o más ARNlnc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra de los pacientes de control indica un aumento de la probabilidad de futura muerte cardiovascular del paciente de ensayo; y/o
- 15 (b') comparar dicho nivel de expresión del uno o más ARNlnc con el nivel de expresión de estos uno o más ARNlnc en una muestra obtenida a partir de pacientes de control con insuficiencia cardiaca crónica, en el que los pacientes de control fallecieron por un suceso cardiovascular en aproximadamente el plazo de tres años después del diagnóstico de insuficiencia cardiaca crónica, y una subexpresión de al menos uno del uno o más ARNlnc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra de los
- 20 pacientes de control indica un aumento de la probabilidad de la supervivencia a largo plazo del paciente de ensayo,

en el que las muestras son muestras de sangre.

25 2. El método de la reivindicación 1, en el que la insuficiencia cardiaca crónica es insuficiencia cardiaca sistólica.

3. Un método para predecir remodelación cardiaca después del infarto de miocardio en un paciente de ensayo que comprende

- 30 (a) detectar el nivel de expresión de uno o más ARNlnc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8, en el que el uno o más ARNlnc es/son o comprende(n) el(los) ARNlnc de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 en una muestra obtenida a partir de dicho paciente de ensayo después del infarto de miocardio, y
- 35 (b) comparar dicho nivel de expresión del uno o más ARNlnc con el nivel de expresión de estos uno o más ARNlnc en una muestra obtenida a partir de pacientes de control después del infarto de miocardio, en el que los pacientes de control no mostraron remodelación cardiaca después del infarto de miocardio, en el que
- 40 (i) las muestras se obtuvieron a partir de dicho paciente de ensayo y de dichos pacientes de control dentro de un plazo de aproximadamente dos semanas después del infarto de miocardio, y una subexpresión de al menos uno del uno o más ARNlnc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra de los pacientes de control indica futura remodelación cardiaca en el paciente de ensayo, y/o
- 45 (ii) las muestras se obtuvieron a partir de dicho paciente de ensayo y de dichos pacientes de control más de aproximadamente dos semanas después del infarto de miocardio, y una sobreexpresión de al menos uno del uno o más ARNlnc en la muestra del paciente de ensayo superior a 2 veces en comparación con la de la muestra de los pacientes de control indica futura remodelación cardiaca en el paciente de ensayo,

en el que las muestras son muestras de sangre.

50 4. El método de la reivindicación 3, en el que la remodelación cardiaca comprende o es remodelación del ventrículo izquierdo.

5. El método de la reivindicación 3 o 4, en el que el plazo de aproximadamente dos semanas es un plazo de aproximadamente 10 días, preferentemente un plazo de aproximadamente 7 días.

55 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que más de aproximadamente dos semanas es más de aproximadamente tres semanas, preferentemente más de aproximadamente cuatro semanas.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la detección del nivel de expresión del uno o más ARNlnc comprende

- 60 (i) PCR cuantitativa, preferentemente PCR cuantitativa en tiempo real, o
- (ii) un método de amplificación de molde/ARN seguido de determinación del nivel de expresión del uno o más ARNlnc usando un método de cuantificación basado en fluorescencia o luminiscencia.

65 8. El método de la reivindicación 7, en el que el uno o más ARNlnc comprende la SEQ ID NO: 1 y en la PCR las secuencias de cebadores de las SEQ ID NOs 19 y 20 se usan para la detección del nivel de expresión de la SEQ ID

NO: 1.

- 5 9. Un método para determinar si un paciente tiene o presenta riesgo de desarrollar una insuficiencia cardiaca, que comprende detectar la expresión de uno o más ARNInc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8, en el que el uno o más ARNInc es/son o comprende(n) el(los) ARNInc de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 en una muestra obtenida a partir de dicho paciente, en el que el paciente tiene o presenta riesgo de desarrollar una insuficiencia cardiaca si la expresión de uno o más ARNInc seleccionados entre las SEQ ID NOs 1 a 8 se detecta en la muestra, en el que el uno o más ARNInc es/son o comprende(n) el(los) ARNInc de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, en el que la muestra es una muestra de sangre.
- 10 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el uno o más ARNInc es o comprende el ARNInc de SEQ ID NO: 1.
- 15 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las muestras de sangre son muestras de plasma.
- 20 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método comprende, antes de la detección del nivel de expresión del ARN no codificante largo, una etapa de amplificación previa del ARN dentro de la muestra del paciente de ensayo y/o la muestra del paciente de control.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el uno o más ARNInc son al menos 3 ARNInc, preferentemente al menos 5 ARNInc, y más preferentemente los 8 ARNInc.

Figura 1

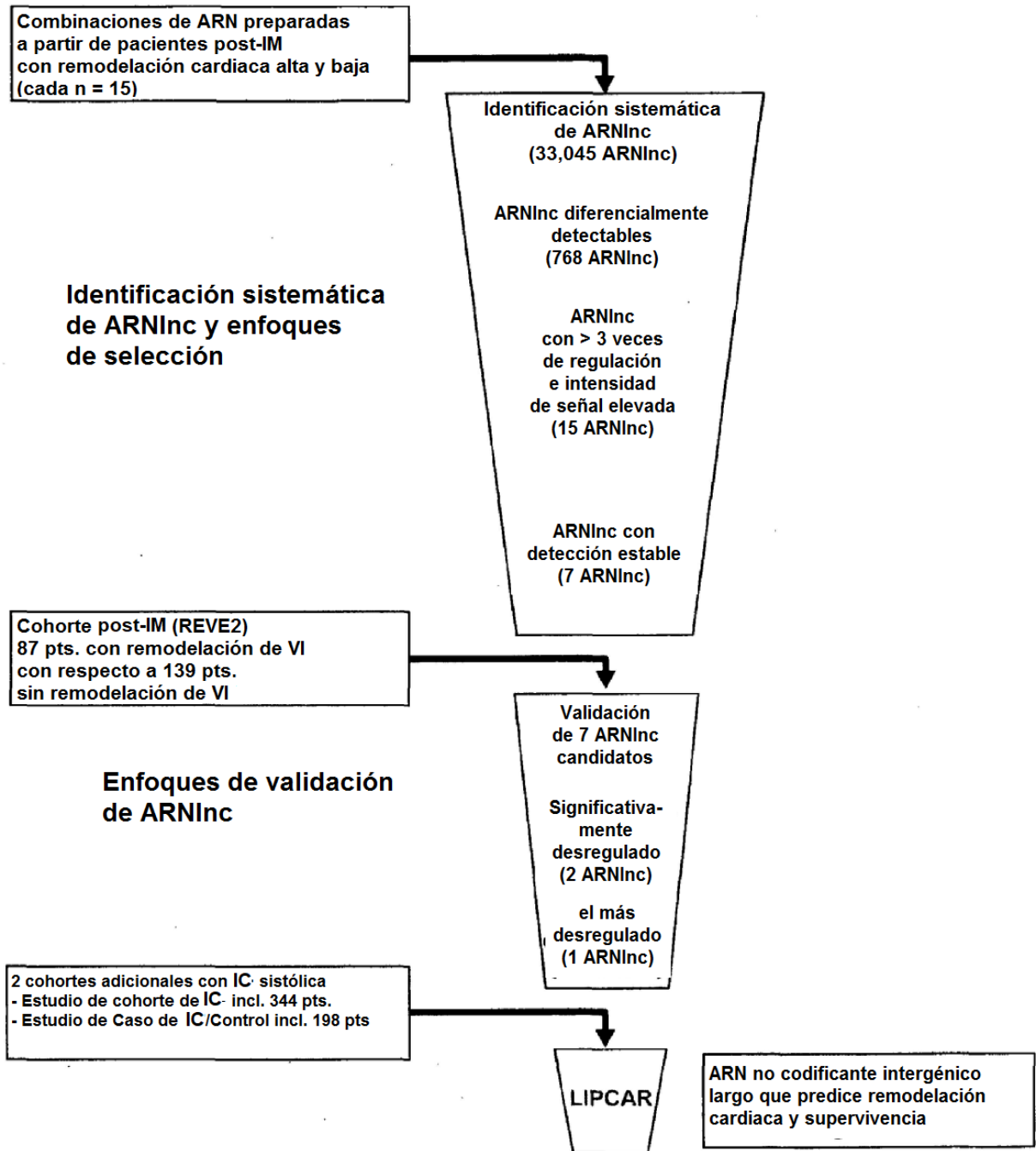


Figura 2

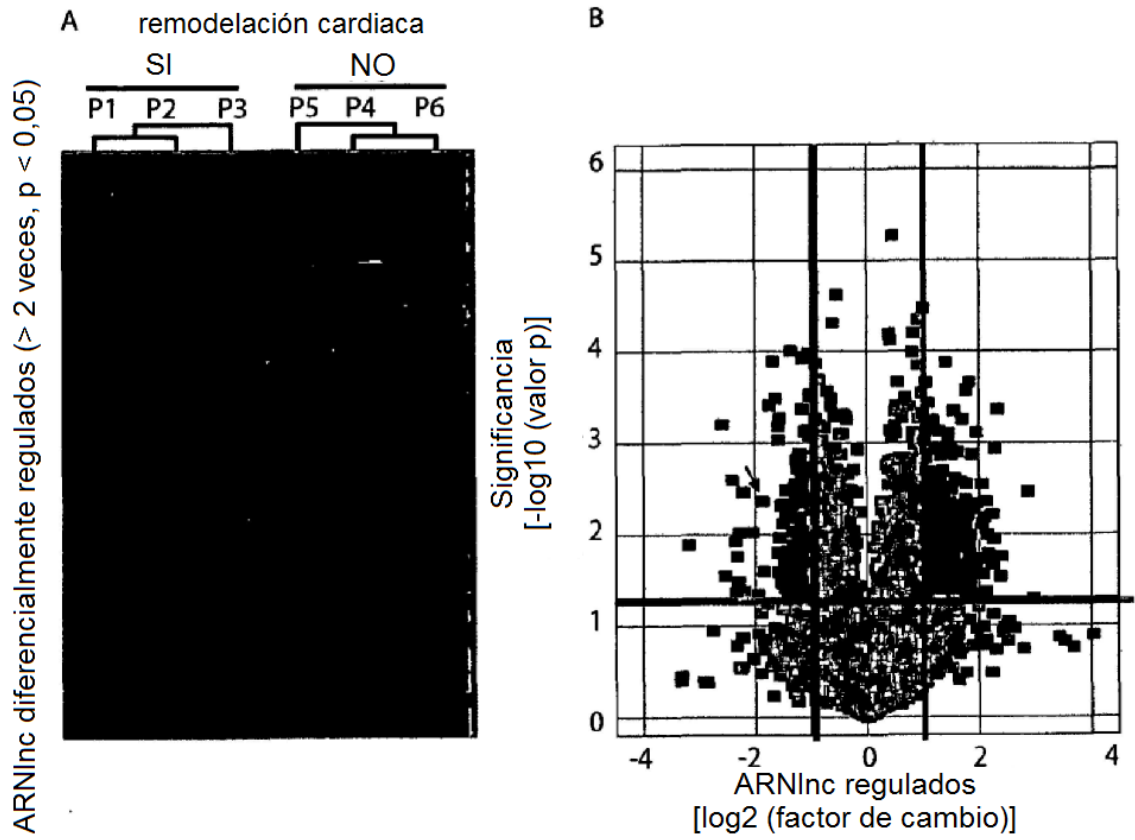


Figura 3

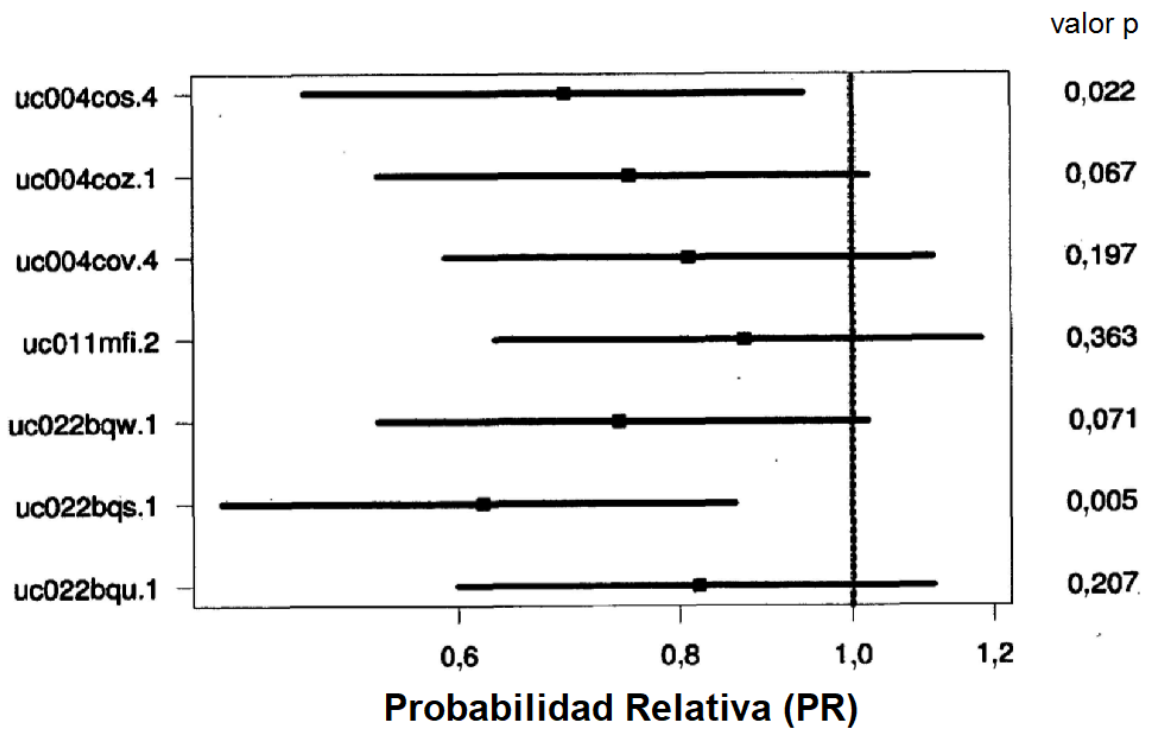


Figura 4

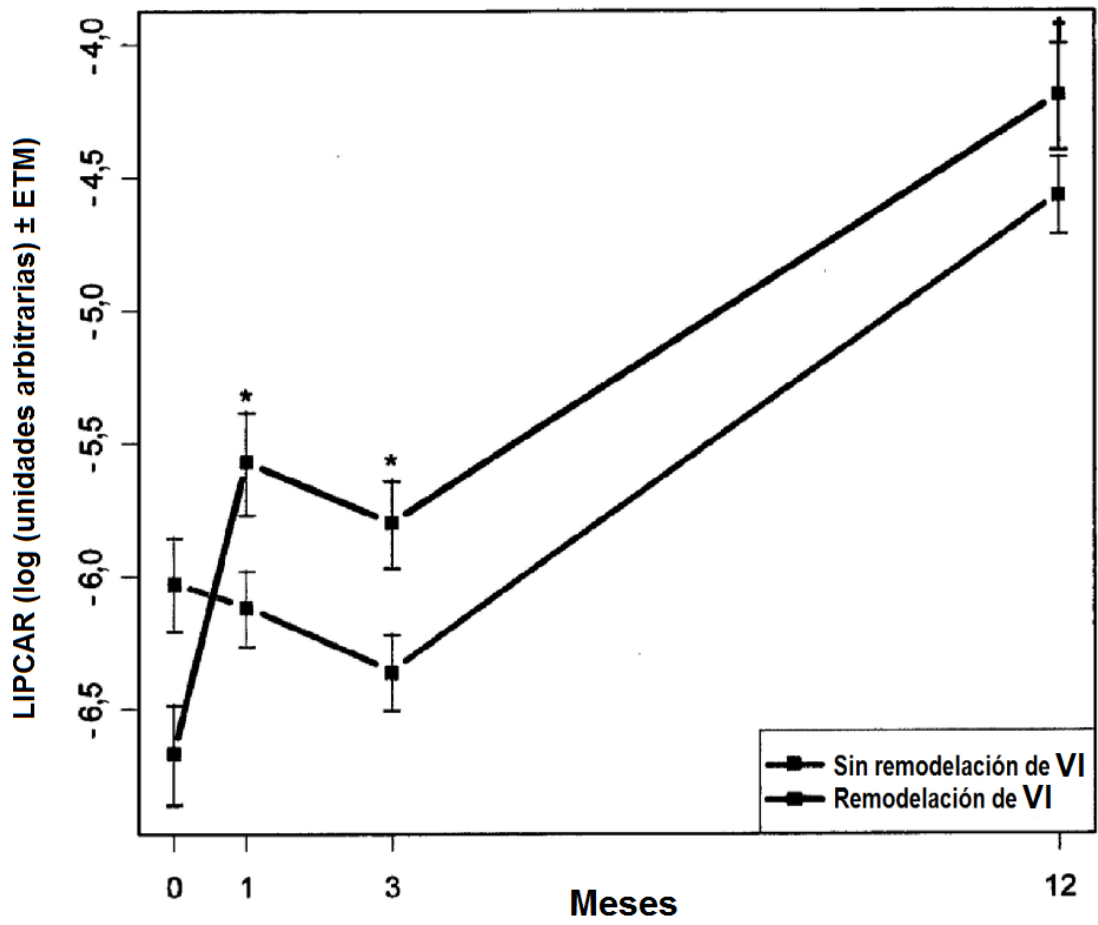


Figura 5

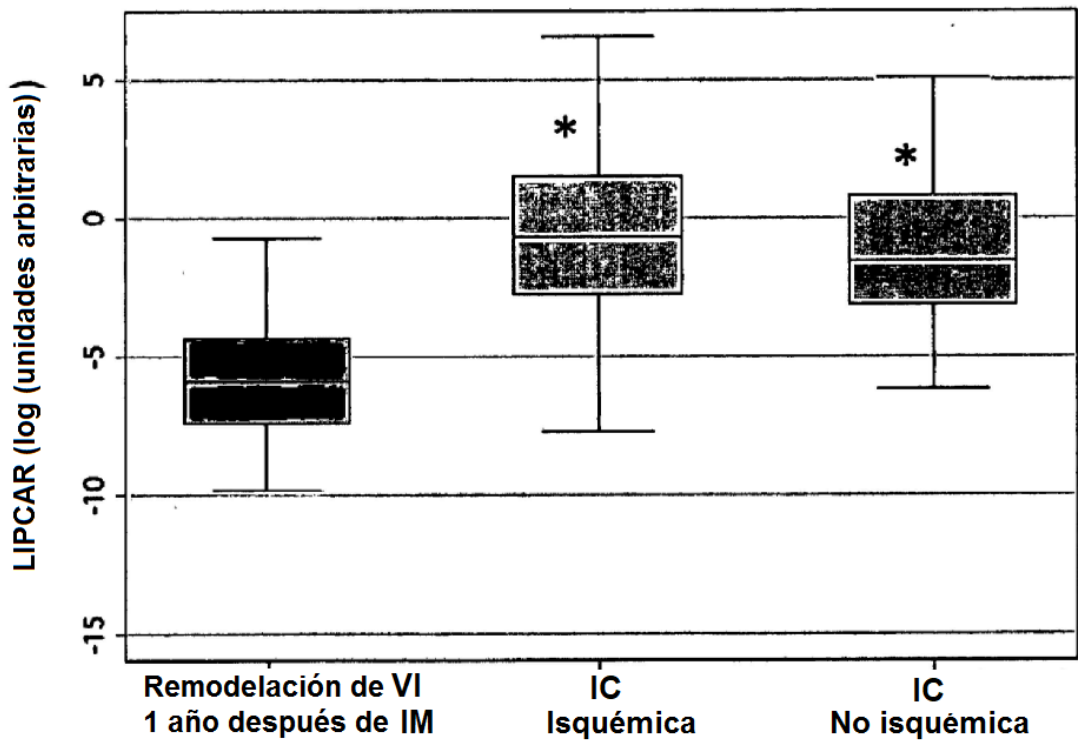


Figura 6

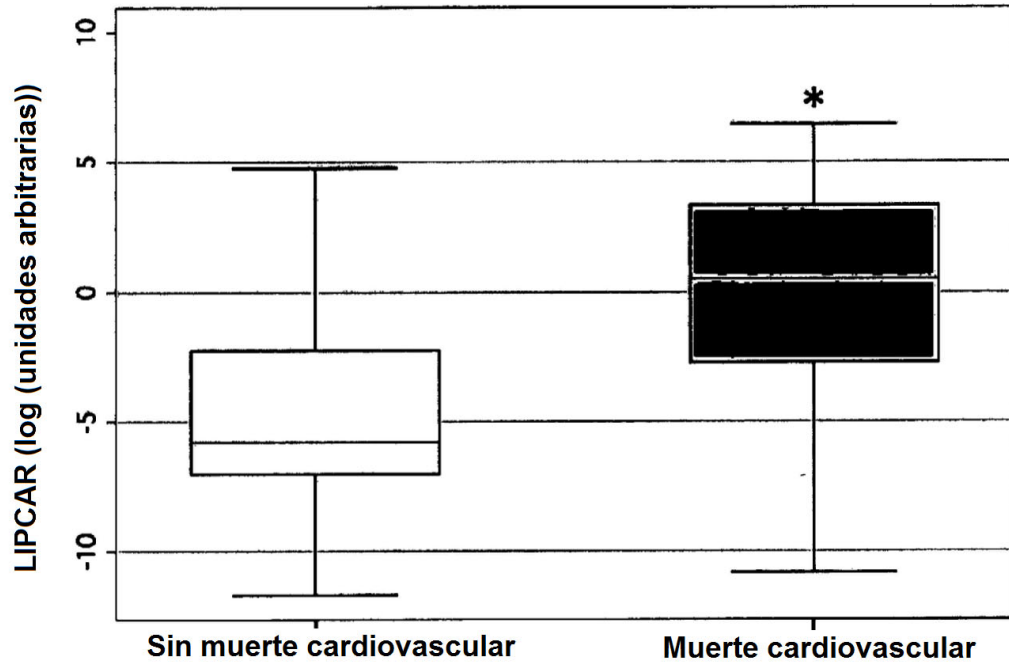
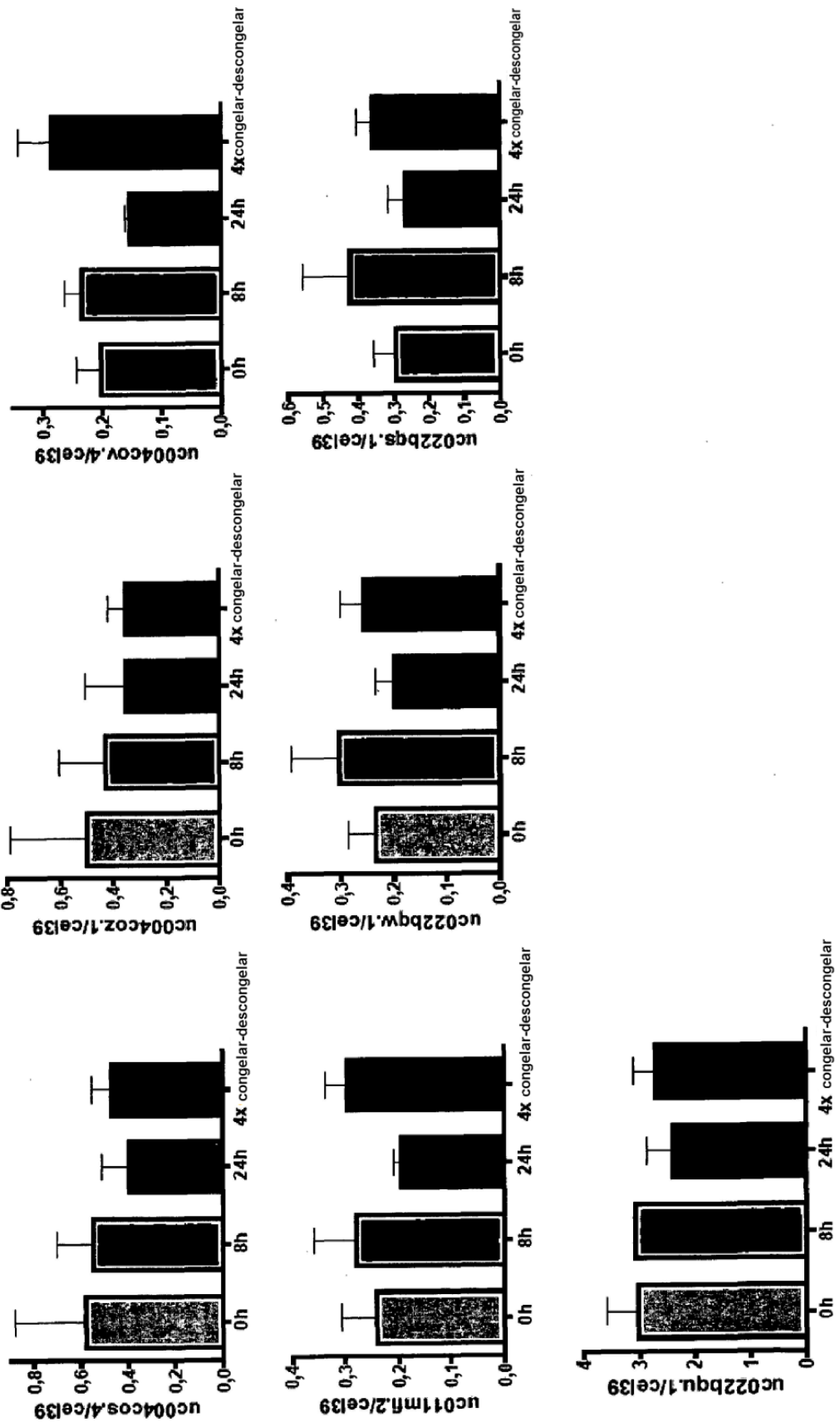


Figura 7



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es para la conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado para la recopilación de las referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la Oficina de Patentes Europea declina toda responsabilidad al respecto.

5

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 15710513 A [0079]
- EP 14160577 A [0079]

10 Literatura no patente citada en la descripción

- MANDEL P ; METAIS P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l' homme. *C R Acad Sci Paris*, 1948, vol. 142, 241-243 [0002]
- LI D et al. *PLOS ONE*, 2013, vol. 8 (10), e77938 [0002]
- KANG Y ; MASSAGUE J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell.*, 2004, vol. 118, 277-279 [0002]
- ANTOS CL et al. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, vol. 99, 907-912 [0002]
- KUNG JT et al. noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics.*, 2013, vol. 193, 651-669 [0002]
- BATISTA PJ ; CHANG HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell.*, 2013, vol. 152, 1298-1307 [0002]
- REIS EM ; VERJOVSKI-ALMEIDA S. Perspectives of Long Non-Coding RNAs in Cancer Diagnostics. *Front Genet.*, 2012, vol. 3, 32 [0002]
- DE KOK. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, 2695-2698 [0002]
- HESSELS D et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol.*, 2003, vol. 44, 8-15 [0002]
- KIM K et al. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. *Oncogene*, 2013, vol. 32, 1616-1625 [0002]
- KUMARSWAMY R ; THUM T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res.*, 2013, vol. 113, 676-689 [0002] [0017]
- SAVOYE C et al. REmodelage VEntriculaire study group. Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (from the REmodelage VEntriculaire [REVE] study group). *Am J Cardiol.*, 2006, vol. 98, 1144-1149 [0002]
- HOYERT D ; XU J. Deaths: Preliminary Data for 2011. *Natl Vital Stat Rep.*, 2012, vol. 61, 1-65 [0003]
- EMDIN M et al. Old and new biomarkers of heart failure. *Eur J Heart Fail.*, 2009, vol. 11, 331-335 [0003]
- BUSTIN. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2002, vol. 29, 23-39 [0015]
- CALZA ; BALWITAN. *Methods Mol Biol.*, 2010, vol. 673, 37-52 [0015]
- MESTDAGH et al. *Genome Biol.*, 2009, vol. 10 (6), R64 [0015]
- MCCORMICK et al. *Silence*, 2011, vol. 2, 2 [0015]
- SAVOYE C et al. Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (from the REmodelage VEntriculaire [REVE] study group). *Am J Cardiol.*, 2006, vol. 98, 1144-1149 [0017]
- ST JOHN SUTTON M et al. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. *Circulation*, 1994, vol. 89, 68-75 [0017]
- SHABEL. *Am J Pathol*, 2008, vol. 172 (6), 1445-1456 [0018]
- FALKENBERG et al. *Annu Rev Biochem*, 2007, vol. 76, 679-99 [0018]
- CHATTERJEE et al. *Journal of Cardiac Failure*, 2007, vol. 13 (7), 569-576 [0021]
- VERMEULEN et al. *BMC Res Notes*, 2009, vol. 2, 235 [0057]
- MESTDAGH et al. *Genome Biology* 2009, 2009, vol. 10, R64 [0057]
- FERTIN M et al. Usefulness of serial assessment of B-type natriuretic peptide, troponin I, and C-reactive protein to predict left ventricular remodeling after acute myocardial infarction (from the REVE-2 study). *Am J Cardiol.*, 2010, vol. 106, 1410-1416 [0066] [0068]
- DE GROOTE P et al. B-type natriuretic peptide and peak exercise oxygen consumption provide independent information for risk stratification in patients with stable congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.*, 2004, vol. 43, 1584-1589 [0069]
- DE GROOTE P et al. Right ventricular systolic function for risk stratification in patients with stable left ventricular systolic dysfunction: comparison of radiouclide angiography to echoDoppler parameters. *Eur Heart J.*, 2012, vol. 33, 2672-2679 [0069]

- **BAUTERS C et al.** Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol.*, 2013, vol. 3 (168), 1837-40 [0070]