

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 198**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2015 PCT/EP2015/080183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097118**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2015 E 15817217 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3234185**

54 Título: **Método para predecir la respuesta al tratamiento con presión de aire positiva continua**

30 Prioridad:

18.12.2014 EP 14382533

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

15.01.2021

73 Titular/es:

**INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA DE LLEIDA
FUNDACIÓ DOCTOR PIFARRÉ (20.0%)
Biomedicina I, Av Alcalde Rovira Roure, 80
25008 Lleida, ES;
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED (20.0%);
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DEL
HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA
FE DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (20.0%);
INSTITUT CATALÀ DE LA SALUT (20.0%) y
UNIVERSITAT DE LLEIDA (20.0%)**

72 Inventor/es:

**BARBE ILLA, EDUARD FERRAN;
SANCHEZ DE LA TORRE, MANUEL;
GOZAL, DAVID;
KHALYFA, ABDELNABY;
SANCHEZ DE LA TORRE, ALICIA y
MARTINEZ GARCÍA, MIGUEL ÁNGEL**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 802 198 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

Método para predecir la respuesta al tratamiento con presión de aire positiva continua

5 La presente invención proporciona métodos *in vitro* para predecir la respuesta a tratamiento con presión positiva continua en las vías respiratorias (CPAP) en pacientes que padecen apnea obstructiva del sueño (OSA) e hipertensión resistente (RH). Los métodos también permiten realizar un seguimiento de la respuesta de los pacientes tratados.

10 **Técnica anterior**

10 La presión positiva continua en las vías respiratorias (CPAP) actúa como una férula neumática en las vías respiratorias altas durante el sueño y corrige la obstrucción. Como tratamiento o terapia, la CPAP usa una presión de aire suave para mantener abierta una vía respiratoria. La CPAP se usa para personas que tienen problemas respiratorios, tales como apnea obstructiva del sueño (OSA), para la cual la CPAP es el tratamiento más eficaz y de referencia, en el que la presión suave de la CPAP impide que las vías respiratorias colapsen o se bloqueen. El tratamiento con CPAP es una terapia diaria en pacientes con apnea obstructiva del sueño. El diagnóstico de OSA y el manejo de pacientes con OSA representan un importante impacto económico en el sistema de salud público.

20 La OSA es una enfermedad altamente prevalente y crónica que las autoridades sanitarias consideran un problema real. Afecta al 10% de la población de mediana edad con una prevalencia creciente con la edad. La OSA se caracteriza por episodios repetidos de colapso u obstrucción de las vías respiratorias altas durante la noche. Estos episodios se asocian con un empeoramiento de la calidad de vida, somnolencia excesiva durante el día, accidentes, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, y están relacionados con un exceso de mortalidad debido a enfermedades cardiovasculares.

25 Además, más del 70% de los pacientes con hipertensión resistente (RH) también padecen OSA. La RH se define como la hipertensión que permanece por encima de la tensión arterial objetivo a pesar de usar, a la vez, tres agentes antihipertensores que pertenecen a diferentes clases de fármacos. Tal como muestran algunos autores, el tratamiento con CPAP conduce a reducciones significativas en la tensión arterial (TA) media de 24 h (véase Martínez-García *et al.*, "Effect of CPAP on Blood Pressure in Patients With Obstructive Sleep Apnea and Resistant Hypertension", Journal of American Medical Association- 2013, vol. n.º 310 (22), págs.: 2407-2415).

35 Sin embargo, la respuesta a la CPAP es muy variable y parece no solo depender de la adhesión al tratamiento, sino que también se especula con algunos factores genéticos. Por tanto, tampoco se ha observado respuesta al tratamiento con CPAP, aunque existe una buena adhesión en algunos pacientes con OSA.

40 Actualmente no hay ningún método para predecir la respuesta al tratamiento con CPAP. Por otro lado, el tratamiento con CPAP es un tratamiento crónico caro para muchos pacientes, incluyendo entre ellos aquellos pacientes con OSA, en los que la OSA se produce o es consecuencia de cualquier otra enfermedad.

45 Por tanto, hay documentos que divulgan algunas variables o parámetros clínicos cardiovasculares que pueden alterarse durante el tratamiento con CPAP, tal como la variabilidad de la frecuencia cardíaca (véase Kufoy *et al.*, "Changes in the Heart Rate variability in Patients with Obstructive Sleep Apnea and Its Response to Acute CPAP Treatment", PlosOne-2012, vol. n.º 7 (3), e33769).

50 Otros documentos se refieren a la adhesión al tratamiento influida por los problemas iniciales de los pacientes (ajuste por el propio paciente), acontecimientos vitales recientes o modo de vida (solo o con otras personas), que se asociaron con un menor uso de la máquina de CPAP. Un ejemplo es el documento de Lewis *et al.*, "Early predictors of CPAP Use for the Treatment of Obstructive Sleep Apnea", Sleep-2004, vol. n.º 1, págs.: 134-138. Lewis *et al.* informaron de que, en relación con todas las variables iniciales, informar de problemas después de la primera noche de tratamientos con CPAP parece ser el factor de predicción más importante del uso posterior de la máquina, y además que una sola pregunta de examen inmediatamente después del ajuste por el propio paciente es útil para identificar a aquellos que presentan alto riesgo de fracaso del tratamiento.

55 Por tanto, es evidente que se requieren métodos nuevos y mejores para predecir la respuesta al tratamiento con CPAP, mejorando la calidad de vida de los pacientes que responden y evitando costes y tiempo con los que no responden, que pueden remitirse a otras terapias alternativas, tal como cirugía, modificaciones del estilo de vida (en particular en sujetos obesos) y el uso de dispositivos de avance mandibular (DAM). Además, la detección temprana de pacientes que responderán adecuadamente al tratamiento con CPAP podría permitir el desarrollo de acciones específicas clínicas y de monitorización con el fin de garantizar una buena adhesión al tratamiento con CPAP por parte de estos pacientes.

60 **Sumario de la invención**

65 Los inventores han descubierto que algunos microARN pueden usarse como marcadores para predecir la respuesta al tratamiento con CPAP en un paciente que necesita tal tratamiento. El alcance de la invención se define por las

reivindicaciones adjuntas.

El microARN (abreviado miARN) es una pequeña molécula de ARN no codificante (que contiene aproximadamente 22 nucleótidos) que se encuentra en plantas, animales y algunos virus, que funciona en el silenciamiento del ARN y en la regulación postranscripcional de la expresión génica. Codificados por ADN nuclear eucariota en plantas y animales y por ADN viral en determinados virus cuyo genoma se basa en ADN, los miARN funcionan a través del emparejamiento de bases con secuencias complementarias dentro de moléculas de ARNm.

Por tanto, según la invención se proponen métodos que implican el análisis de los niveles de expresión de microARN, que se han detectado que se expresan de manera diferencial entre pacientes que responden y que no responden tratados con CPAP. Un paciente que responde es uno que muestra una disminución de la tensión arterial (TA) de al menos 4,5 mm Hg en relación con la TA inicial antes del tratamiento.

Los métodos de la invención son métodos fiables y proporcionan altos valores de sensibilidad y especificidad. Además, los métodos pueden aplicarse fácilmente a las clínicas debido a que se proporciona un parámetro de puntuación cuantitativo que informa al médico de la probabilidad o no de respuesta.

En un primer aspecto, la divulgación se refiere a métodos *in vitro* para predecir la respuesta al tratamiento con CPAP, comprendiendo el método determinar en una muestra aislada de un sujeto el nivel de expresión de un microARN relacionado funcionalmente con el sistema cardiovascular y relacionado con enfermedad cardiovascular, seleccionándose dicho microARN del grupo que consiste en miR.100.5p, miR.378a.3p, miR.486.5p y combinaciones de los mismos.

Las secuencias de todos estos microARN pueden recuperarse a partir de la base de datos miRbase (www.mirbase.org) versión 21 de junio de 2014. Pueden obtenerse secuencias de *Homo sapiens* y de otras especies indexadas. En particular, los números de registro en miRbase de los microARN mencionados a continuación en el presente documento son: miR.378a.3p (MIMAT0000732), miR.100.5p (MIMAT0000098) y miR.486.5p (MIMAT0002177).

Por tanto, la invención propone por primera vez la asociación de los niveles de expresión de uno o más microARN relacionados con enfermedad cardiovascular, así como combinaciones particulares de dichos microARN, para predecir la respuesta al tratamiento con CPAP en un sujeto que podría beneficiarse de dicho tratamiento.

Tal como se representará en los ejemplos a continuación, los métodos de la invención predicen de una manera altamente específica y sensible la probabilidad de respuesta al tratamiento con CPAP en un paciente (sujeto) que lo necesita. Por tanto, se identifican pacientes que responden.

Es de destacar que los microARN, que se ha detectado que se expresan de manera diferencial entre pacientes/sujetos que responden y que no responden que luego se tratan con CPAP, son todos ellos microARN que también se expresan de manera diferencial en pacientes con riesgo de disfunción cardiovascular o que ya padecen alguna disfunción cardiovascular en relación con sujetos sanos (sujeto sin enfermedad cardiovascular o sin riesgo de enfermedad). Dicho de otro modo, son los microARN más relevantes para enfermedad cardíaca o asociados con enfermedad cardiovascular. La comunidad científica ha establecido y aceptado que los miARN son cruciales para el desarrollo y el funcionamiento adecuado del corazón (Véase Small *et al.*, "MicroRNA add a new dimension to Cardiovascular Disease", *Circulation*-2010, vol. n.º 121, págs.: 1022-1032). Por tanto, por ejemplo, miR.100.5p se ha asociado con miocardiopatía, en la que está regulada por incremento o en niveles superiores a sujetos sanos (véase Da Costa *et al.*, "MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy", *Cardiovascular Research*-2012, vol. n.º 93, págs.: 563-572); miR.378a.3p se ha asociado con la capacidad para determinar la eficacia de los fármacos para afecciones cardíacas (véase el documento WO2012083004); y miR.486.5p se ha propuesto como marcador de enfermedad cardiovascular (véase el documento WO2012065113 y Da Costa *et al.*, citado anteriormente), en particular como marcador junto con otros miARN de aneurisma aórtico torácico, de insuficiencia cardíaca diastólica en el sujeto, de hipertrofia ventricular izquierda en ausencia de insuficiencia cardíaca diastólica, de remodelado ventricular izquierda, de isquemia-reperfusión, o una combinación de estas enfermedades.

Determinar si un sujeto responderá o no al tratamiento con CPAP le permite al médico decidir con gran parte de la información crucial el tratamiento que debe recomendarse.

Por tanto, en un segundo aspecto la divulgación también se refiere a métodos para seleccionar o recomendar el inicio del tratamiento con CPAP, comprendiendo el método una etapa de determinar en una muestra aislada de un sujeto el nivel de expresión de un microARN relacionado funcionalmente con el sistema cardiovascular y relacionado con enfermedad cardiovascular, seleccionándose dicho microARN del grupo que consiste en miR.100.5p, miR.378a.3p, miR.486.5p, y combinaciones de los mismos, y en los que el tratamiento con CPAP está indicado o recomendado si el nivel de expresión de uno cualquiera de miR.100.5p, miR.378a.3p, miR.486.5p está dentro de un intervalo de niveles de expresión indicativos de respuesta a CPAP.

Todos estos métodos pueden realizarse usando medios específicos para detectar la expresión de microARN. Por tanto, en un tercer aspecto, la divulgación también se refiere al uso de medios para detectar la expresión de un

microARN en una muestra aislada de un sujeto, comprendiendo dichos medios reactivos de reacción en cadena de polimerasa (PCR), o reactivos de transferencia de tipo Northern, para la predicción de respuesta a presión positiva continua en las vías respiratorias (CPAP) en cualquiera de los métodos tal como se definió anteriormente.

5 También forma parte de la divulgación un kit para detectar los niveles de expresión de microARN en una muestra aislada de un sujeto, consistiendo dicho kit en medios para determinar los niveles de expresión de miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p.

10 Además, también forma parte de la divulgación el uso del nivel de expresión de un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR.100.5p, miR.378a.3p, miR.486.5p, y combinaciones de los mismos, como marcador para predecir la respuesta al tratamiento con presión positiva continua en las vías respiratorias (CPAP) en un sujeto que lo necesita.

15 Es de destacar que los inventores también proponen usar estos niveles de expresión de microARN para predecir la reducción del riesgo cardiovascular en sujetos que se etiquetarán como que responden a CPAP mediante cualquiera de los métodos divulgados anteriormente. Esto es así porque en un sujeto que es probable que responda según sus niveles de expresión de microARN antes del tratamiento con CPAP, también es probable que su tensión arterial disminuya y, por tanto, cualquier riesgo cardiovascular asociado con tensión arterial alta.

20 Determinar si un sujeto responderá a CPAP antes de comenzar el tratamiento es de gran valor no solo porque, tal como se expuso anteriormente, el tratamiento es poco factible y caro, sino también porque la CPAP implica muchos efectos adversos secundarios o incluso efectos nocivos si la adhesión al tratamiento no es la apropiada. Por tanto, si es poco probable que un sujeto responda, se evitan complicaciones adicionales si la CPAP se excluye de las opciones de tratamiento.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 (A a C) muestra diagramas de cajas para niveles de miR100.5p (como dCt miR100.5p), niveles de miR.378a.3p (como dCt miR.378a.3p) y niveles de miR.486.5p (como dCtmiR.486.5p), respectivamente, en relación con la respuesta a CPAP (expresada como intervalos de valores en el eje X que indican grados de respuesta a CPAP).

30 Las figuras 2 y 3 son diagramas de cajas para niveles de miR100.5p (como dCt miR100.5p) y niveles de miR.378a.3p (como dCt miR.378a.3p), respectivamente, para pacientes que no responden (A) y pacientes que responden (B) a CPAP.

35 La figura 4 representa una curva ROC del método para predecir la respuesta a CPAP usando un modelo con niveles combinados de miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p a partir de una muestra aislada. El eje X muestra 1-la especificidad y el eje Y, la sensibilidad.

40 La figura 5 (A a C) muestra diagramas de cajas con el cambio en la tensión arterial media (Δ TAM), medido como la diferencia de la TAM inicial menos la TAM final, representado en relación con un punto de corte para cada dCt miARN en el nivel inicial. Los pacientes que responden se representan en la caja de la derecha de cada gráfico, y los pacientes que no responden en la caja de la izquierda en cada gráfico. Las flechas indican la mediana de los valores.

45 **Descripción detallada de la invención**

50 Todos los términos tal como se usan en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se entenderán en su significado habitual tal como se conoce en la técnica. Otras definiciones más específicas para determinados términos tal como se usan en la presente solicitud son tal como se expone a continuación y se pretende que se apliquen de manera uniforme a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, a menos que una definición expuesta expresamente proporcione una definición más amplia.

55 En el sentido de la presente invención, las expresiones “nivel de expresión de microARN” o “niveles de expresión de microARN” (usados indistintamente) engloban la cantidad de microARN (expresada en general como umbral de ciclo (Ct)) detectada en la muestra por cualquier medio para el análisis de ARN, como PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). La RT-PCR se usa para clonar genes expresados mediante la transcripción inversa del ARN de interés en su complemento de ADN a través del uso de la transcriptasa inversa. Posteriormente, el ADNc recién sintetizado se amplifica para la aplicación de la PCR cuantitativa. En comparación con otros métodos de cuantificación de ARN, tales como la transferencia de tipo Northern, la qRT-PCR se considera el ensayo más potente, sensible y cuantitativo para la detección de niveles de ARN. Los niveles de expresión de microARN habitualmente están representados por el umbral de ciclo (Ct), que es el número de ciclos requerido para que una señal fluorescente usada en la prueba exceda un umbral predeterminado. Por tanto, Ct es el valor en el que la señal fluorescente supera el nivel de fondo. Los valores de Ct se expresan en la escala logarítmica de base 2 y no tienen unidades. El Ct para un microARN particular es, por tanto, inversamente proporcional al número o copias de miARN en una muestra (es decir, a la cantidad de ácido nucleico objetivo). Cuanto más bajo es el nivel de Ct, mayor es la cantidad de miARN en la muestra. Dado que la cuantificación de la expresión de miARN está influida por la variabilidad en las condiciones técnicas, así como por la variabilidad biológica, generalmente se realiza la normalización de los

niveles de expresión de Ct restando los niveles de expresión de Ct de un gen de mantenimiento. Los genes de mantenimiento son genes expresados con baja variabilidad entre muestras biológicas y, por tanto, son útiles para minimizar la variabilidad de la expresión. Un ejemplo de gen de mantenimiento es el gen SNORD95 que se sabe que permanece constante durante las condiciones experimentales y de vida y cuya variabilidad sólo está influida por la variabilidad técnica (el número de registro de GeneBank de SNORD95 es AY349594, versión 1 del 14.11.2003).

En el sentido de la invención, el término “enfermedad cardiovascular” o “disfunción cardiovascular” o “riesgo de disfunción cardiovascular” (usado en el presente documento como sinónimo) se refiere a aquellas enfermedades que implican o bien corazón o bien vasos sanguíneos o ambos que al final afectan al sistema cardiovascular. Los ejemplos incluyen infarto de miocardio e isquemia miocárdica, arritmias cardíacas, accidente cerebrovascular, hipertensión sistémica (incluyendo hipertensión resistente), muerte súbita e insuficiencia cardíaca. El término “enfermedad relacionada con enfermedad cardiovascular” se refiere a enfermedades que pueden ser la causa o consecuencia de una enfermedad cardiovascular. Entre estas “enfermedades relacionadas con enfermedad cardiovascular” se encuentran la apnea obstructiva del sueño, estando asociada esta última también a pacientes con riesgo de enfermedad cardiovascular o que aún padecen alguna enfermedad cardiovascular.

El “valor de control de referencia” significa en el contexto de la presente invención, el nivel o la cantidad de un microARN particular derivado de un grupo de sujetos y que permite la clasificación de una muestra sometida a prueba procedente de un sujeto en un grupo de pacientes que responden a CPAP o en un grupo de pacientes que no responden a CPAP. Además, en el contexto de la invención, el valor de control de referencia puede ser el punto de corte que permite clasificar una muestra de prueba en un grupo en el que el tratamiento con CPAP ya está teniendo efecto, o en un grupo en el que el tratamiento con CPAP aún no está teniendo efecto. Además, cuando en la presente invención se emplea la expresión “fuera de referencia”, debe entenderse que los niveles o la cantidad de un microARN analizado particular está por encima o por debajo de un punto de corte determinado para dicho microARN. Las muestras pueden tomarse de un sujeto o grupo de sujetos en los que la presencia, ausencia, fase o curso de una respuesta particular a CPAP se ha realizado correctamente antes. Este valor se usa como umbral para discriminar sujetos en los que está presente el estado que va a analizarse de aquellos en los que dicho estado está ausente. Los valores de control de referencia habitualmente se determinan considerando características similares de los sujetos (edad, sexo, raza, etc.). Además, el valor de control de referencia puede ser un valor del mismo sujeto pero medido en diferentes puntos de tiempo, que es el caso particular cuando se emplea un método para determinar si un sujeto que recibe CPAP está respondiendo a dicho tratamiento con CPAP. El experto en la materia, haciendo uso del conocimiento general, puede elegir el sujeto o grupo de sujetos más adecuados para obtener el nivel de control de referencia para cada uno de los métodos de la presente invención. Los métodos para obtener el valor de referencia del grupo de sujetos seleccionados se conocen bien en el estado de la técnica.

Los métodos para obtener el valor de referencia del grupo de sujetos seleccionados se conocen bien en el estado de la técnica (Burtis C.A. *et al.*, 2008, capítulo 14, sección “Statistical Treatment of Reference Values”). En un caso particular, el valor de control de referencia es un valor de punto de corte definido por medio de un análisis de convencional ROC (análisis de rendimiento diagnóstico).

Tal como se expuso anteriormente, la divulgación engloba métodos *in vitro* para predecir la respuesta a presión positiva continua en las vías respiratorias (CPAP) en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método determinar en una muestra aislada de un sujeto el nivel de expresión de microARN relacionados funcionalmente con el sistema cardiovascular y microARN relacionado con enfermedad cardiovascular (microARN que se sabe que se expresan de manera diferencial en pacientes con disfunción cardiovascular o con riesgo de disfunción cardiovascular), seleccionándose dichos microARN del grupo que consiste en miR.100.5p, miR.378a.3p, miR.486.5p, y combinaciones de los mismos.

En una realización particular del primer aspecto de la divulgación, opcionalmente en combinación con cualquier realización a continuación, la respuesta a presión positiva continua en las vías respiratorias es una disminución de la tensión arterial, expresada como la diferencia en la tensión arterial inicial menos la tensión arterial final después de la CPAP. En una realización más particular, la respuesta a presión positiva continua en las vías respiratorias es una disminución de la tensión arterial de al menos 4,5 mm Hg en relación con la tensión arterial inicial antes del tratamiento.

En otra realización más particular, la respuesta a presión positiva continua en las vías respiratorias es una disminución de la tensión arterial de al menos 4,5 mm Hg en relación con la tensión arterial inicial antes del tratamiento y el sujeto que lo necesita es un paciente que padece una enfermedad cardiovascular o una enfermedad relacionada con enfermedad cardiovascular seleccionada del grupo que consiste en apnea obstructiva del sueño (OSA), hipertensión resistente y mezclas de estas enfermedades.

En otra realización particular del primer aspecto de la divulgación opcionalmente en combinación con cualquier realización a continuación, el nivel de expresión de un microARN de interés se detecta mediante PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa y se expresa como un valor de dCT calculado según la fórmula (I),

dCt = Ct microARN – Ct gen de mantenimiento (I)

en la que:

- Ct es un umbral de ciclo, identificado como el número de ciclos en el ensayo de PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa requerido para que una señal fluorescente usada en el mismo exceda un umbral predeterminado;

- 5
- Ct microARN son los niveles de umbral de ciclo de microARN de interés;
- Ct gen de mantenimiento indica los niveles de umbral de ciclo de un gen de mantenimiento; y
- 10 - dCt es la diferencia entre los niveles de umbral de ciclo de microARN, en la escala logarítmica de base 2, y el nivel de umbral de ciclo de un ARN de mantenimiento, en la escala logarítmica de base 2.

Por tanto, para una muestra aislada particular dCt para cada miARN de interés se calcula por medio de la fórmula (I) y este valor se contrasta con un valor de dCT de control de referencia.

15 En una realización más particular, el gen de mantenimiento es el gen que codifica para un ARN conocido como el ARN nucleolar pequeño 95 (SNORD95).

20 En una realización particular del primer aspecto de la invención, se determinan los niveles de expresión de miR.100.5p. Aún en una realización más particular, los niveles de expresión de miARN se determinan mediante un valor de dCT calculado según la fórmula (I), y en la que si el dCt de miR.100.5p es menor que un valor de control de referencia, es indicativo de respuesta a CPAP.

25 En la realización más particular, el control de referencia para miR.100.5p es un valor de dCT de 0,75, y el gen de mantenimiento es SNORD95.

30 El análisis univariante del nivel de expresión de miR.100.5p permite una buena clasificación de sujetos que responden bien de aquellos que responden de manera extremadamente mala. Un paciente que responde bien significa que al recibir CPAP, el sujeto responde rápidamente y se baja la TA. Por otro lado, los pacientes que responden de manera extremadamente mala son aquellos sujetos en los que tras recibir CPAP se observa una disminución nula de la TA.

35 Una cantidad de microARN de miR.100.5p, expresada como dCt (miR.100.5p), mayor o menor que 0.75 permite clasificar un paciente que responde bien de pacientes que responden de manera extremadamente mala a CPAP con un área bajo la curva ROC del 91,7%.

40 Los inventores también desarrollaron un modelo usando los niveles de expresión tanto de miR.378a.3p como de miR.486.5p que permiten clasificar con alta sensibilidad y especificidad a los sujetos con todo tipo de respuestas buenas y malas a CPAP. Este modelo permite, por tanto, una buena clasificación de aquellos que responden que tal vez no respondan tan rápido como un paciente que responde bien de aquellos que no responden que, aunque no sean pacientes que responden de manera extremadamente mala, también deben etiquetarse clínicamente como que no responden.

45 En una realización más particular, los niveles de expresión de miR.378a.3p y de miR.486.5p se determinan calculando para cada uno un valor de dCT también según la fórmula (I). Aún en una realización más particular, el gen de mantenimiento de fórmula (I) es SNORD95.

Por tanto, en una realización más particular del primer aspecto de la invención, el método comprende determinar al menos los niveles de expresión de dos miARN, y:

50 (i) calcular una puntuación de probabilidad (S) de respuesta a CPAP que resulta de la suma de puntuaciones discretas individuales dadas a los niveles de expresión de cada microARN; y

(ii) determinar que el sujeto responderá a CPAP si la puntuación de probabilidad está dentro de un intervalo de puntuaciones de probabilidad indicativas de respuesta.

55 Cuando se determina más de un miARN, y en particular los niveles de expresión de miR.378a.3p y de miR.486.5p, el método del primer aspecto de la invención comprende además:

60 (i) calcular una puntuación de probabilidad (S) de respuesta a CPAP que resulta de la suma de puntuaciones discretas individuales, siendo dichas puntuaciones discretas individuales las dadas a los niveles de expresión de cada microARN; y

(ii) determinar que el sujeto responderá a CPAP si la puntuación de probabilidad está dentro de un intervalo de puntuaciones de probabilidad indicativas de respuesta.

65 Cuando se determinan tanto los niveles de miR.378a.3p como los de miR.486.5p, se obtiene una alta capacidad de

discriminación (AUC = 0,88) entre los sujetos que responden y que no responden a CPAP, tal como se representará en los ejemplos a continuación. En una realización más particular, los niveles de miR.378a.3p y de miR.486.5p se determinan mediante PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa, se expresan como un valor de dCT según la fórmula (I) tal como se definió anteriormente; y se calcula la puntuación de probabilidad (S) de respuesta a CPAP a partir de la suma de las puntuaciones discretas individuales dadas a los niveles de expresión de miR.378a.3p y de miR.486.5p, en el que dichas puntuaciones discretas individuales se dan a cada uno de los niveles de expresión del microARN según los siguientes criterios:

- añadir 1 si los niveles de miR.486.5p, expresados como un valor de dCT según la fórmula (I), son mayores que un valor de dCT de control de referencia, lo más particularmente mayores que un valor de dCT de -7,2;

- añadir un 2 si los niveles de miR.378a.3p, expresados como un valor de dCT según la fórmula (I), son menores que o iguales a un valor de dCT de control de referencia, lo más particularmente menores que o iguales a un valor de dCT de 2,6;

y en el que una puntuación de probabilidad de desde 2 hasta 3 es indicativa de respuesta a CPAP.

Los valores de dCT particulares de -7,2 y 2,6 se calculan según la fórmula (I) en la que el gen de mantenimiento es SNORD95.

Por tanto, en una realización particular se propone determinar primero los niveles de expresión de miR.100.5p y si se desea una mayor capacidad de discriminación, se realiza un análisis adicional de los niveles de expresión de miR.378a.3p y de miR.486.5p.

Precisamente con el fin de mejorar la sensibilidad y la especificidad del método de la invención, los inventores proponen en otra realización preferida del primer aspecto de la invención, opcionalmente en combinación con cualquier realización a continuación o anterior, determinar el nivel de expresión de miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p.

Cuando se determinan los niveles de expresión de los tres miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p, y con el fin de que el método se aplique de manera más factible en clínicas (implementación clínica fácil), el método para la predicción de la respuesta a CPAP según el primer aspecto de la invención comprende:

(i) obtener una puntuación de probabilidad (S) de respuesta a CPAP, calculándose dicha puntuación de probabilidad a partir de la suma de puntuaciones discretas individuales dadas a cada uno de los niveles de expresión de miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p; y

(ii) determinar que el sujeto responderá a CPAP si la puntuación de probabilidad (S) calculada está dentro de un intervalo de puntuaciones de probabilidad indicativas de respuesta.

En una realización más preferida, cuando se calcula una puntuación de probabilidad, el nivel de expresión de miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p se determinan mediante PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa; se expresan como un valor de dCT según la fórmula (I) tal como se definió anteriormente; y se calcula una puntuación de probabilidad (S) de respuesta a CPAP a partir de la suma de las puntuaciones discretas individuales dadas a cada uno de los niveles de expresión de miR.100.5p, de miR.378a.3p y de miR.486.5p, siendo dichas puntuaciones discretas individuales dadas a los niveles de expresión de cada microARN según los siguientes criterios:

- añadir 1 si los niveles de miR.100.5p, expresados como un valor de dCT según la fórmula (I), son mayores que un valor de dCT de control de referencia;

- añadir un 2 si los niveles de miR.486.5p, expresados como un valor de dCT según la fórmula (I), son mayores que un valor de dCT de control de referencia; y

- añadir un 3 si los niveles de miR.378a.3p, expresados como un valor de dCT según la fórmula (I), son menores que un valor de dCT de referencia;

y en el que una puntuación de probabilidad (S) de desde 4 hasta 6 es indicativa de respuesta a CPAP.

En particular, una puntuación de probabilidad de desde 4 hasta 6 es indicativa de respuesta a CPAP en una probabilidad de desde el 84% hasta el 100%. Una puntuación de probabilidad de desde 0 hasta 1 es indicativa de ausencia de respuesta a CPAP en una probabilidad de desde el 85,7% hasta el 96,2%.

En una realización preferida, cuando se calcula una puntuación de probabilidad de respuesta a CPAP, el valor de dCT de referencia para la expresión de miR.100.5p (dCtmiR.100.5p) es de 0,4, y se añade un 1 a la puntuación cuando dCtmiR.100.5p es menor de 0,4. En otra realización preferida, opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o a continuación, el valor de dCT de referencia para la expresión de miR.486.5p (dCtmiR.486.5p) es de -7,1, y se añade un 2 a la puntuación cuando dCtmiR.486.5p es mayor de -7,1. En otra realización preferida, opcionalmente

en combinación con cualquier realización anterior o a continuación, el valor de dCT de referencia para la expresión de miR.378a.3p (dCt miR.378a.3p) es de 2,6, y se añade un 3 a la puntuación cuando dCtmiR.486.5p es menor de 2,6.

5 Los valores de dCT particulares de 0,4, -7,1 y 2,6 se calculan según la fórmula (I) en la que el gen de mantenimiento es SNORD95.

10 Mediante el uso de este modelo que incluye determinar los niveles de expresión de los tres miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p y obtener adicionalmente una puntuación de probabilidad de respuesta a CPAP, si la puntuación de probabilidad es de desde 0 hasta 1 la probabilidad de respuesta al tratamiento con CPAP es de desde el 3 hasta el 15%, y si la puntuación de probabilidad es de desde 2 hasta 3, la probabilidad de respuesta al tratamiento con CPAP es de desde el 40% hasta el 80%.

15 Cuando se determinan los niveles de expresión de los tres miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p, se obtiene una alta capacidad de discriminación (AUC ROC = 0,91) entre los sujetos que responden y que no responden a CPAP, tal como se representará en los ejemplos a continuación. Adicionalmente, este modelo puede aplicarse a todos los tipos de sujetos (que responden extremadamente bien, que responden bien, que no responden y que responden extremadamente mal) y por tanto, se obtiene una buena clasificación independientemente del grado de respuesta. Tal como se representará en los ejemplos a continuación, este modelo que usa al menos la determinación de la expresión de los tres miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p resulta de una cohorte de muestras con diferentes grados de respuesta a CPAP, y que se validó adicionalmente en una cohorte independiente.

25 En una realización particular de cualquiera de los aspectos y realizaciones de la divulgación, el sujeto es un paciente que padece una enfermedad cardiovascular o una enfermedad relacionada con enfermedad cardiovascular seleccionada del grupo que consiste en apnea obstructiva del sueño (OSA), hipertensión resistente, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, arritmias cardíacas, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca y mezclas de estas enfermedades. En una realización más particular, el sujeto es un paciente que padece una enfermedad cardiovascular o una enfermedad relacionada con enfermedad cardiovascular seleccionada del grupo que consiste en apnea obstructiva del sueño (OSA), hipertensión resistente y mezclas de estas enfermedades.

30 En la realización más particular, opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o a continuación, el paciente es un paciente que padece apnea obstructiva del sueño, y más particularmente un sujeto que padece apnea obstructiva del sueño con hipertensión resistente.

35 En otra realización particular, opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o a continuación, la muestra aislada se selecciona del grupo que consiste en sangre (que a su vez puede seleccionarse de suero, plasma o sangre completa), saliva, un lavado broncoalveolar y orina.

40 En otra realización particular, opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o a continuación, la respuesta a CPAP significa que la tensión arterial (TA) disminuye $\leq 4,5$ mm Hg (al menos 4,5 mm Hg, equivalente a 0,6 kPa) en relación con la TA inicial antes del tratamiento con CPAP.

45 La divulgación también se refiere a métodos para seleccionar o recomendar el inicio del tratamiento con CPAP a un paciente que padece una enfermedad cardiovascular o una enfermedad relacionada con enfermedad cardiovascular seleccionada del grupo que consiste en apnea obstructiva del sueño (OSA), hipertensión resistente, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, arritmias cardíacas, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca y mezclas de estas enfermedades, comprendiendo los métodos una etapa de determinar en una muestra aislada de un paciente el nivel de expresión de un microARN relacionado funcionalmente con el sistema cardiovascular y un microARN relacionado con enfermedad cardiovascular, seleccionándose dicho microARN del grupo que consiste en miR.100.5p, miR.378a.3p, miR.486.5p y combinaciones de los mismos, y en los que el tratamiento con CPAP está indicado o recomendado si el nivel de expresión de uno cualquiera de miR.100.5p, miR.378a.3p, miR.486.5p está dentro de un intervalo de niveles de expresión indicativos de respuesta a CPAP, lo que significa que una respuesta tendrá lugar con una alta probabilidad, en particular con una probabilidad de desde el 84% hasta el 100% .

55 En una realización preferida de estos métodos para seleccionar o recomendar el inicio del tratamiento con CPAP, la muestra aislada también se selecciona del grupo que consiste en sangre (que a su vez puede seleccionarse de suero, plasma o sangre completa), saliva, lavado broncoalveolar y orina. En cualquier caso, es útil una muestra del sujeto que comprenda células o fluidos de los que pueda aislarse microARN.

60 Entre los medios particulares usados para detectar la expresión de un microARN en una muestra aislada de un sujeto con el fin de predecir la respuesta a presión positiva continua en las vías respiratorias (CPAP) en un método tal como se definió anteriormente, puede incluirse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sondas, cebadores y tampones apropiados para detectar uno cualquiera de miR.100.5p, miR.378a.3p o miR.486.5p. De hecho, medios más particulares son cebadores para la amplificación de miR.100.5p, miR.378a.3p o miR.486.5p, que pueden proporcionarse por separado o en un conjunto de pares de cebadores. Todos estos medios pueden formar parte de un kit o matriz que incluye todos los reactivos e instrucciones para detectar dichos microARN. Un ejemplo de dichas matrices es la matriz de PCR de miARN de enfermedad cardiovascular humana de Qiagen®, MIHS-113Z, que perfila

la expresión de 84 miRNA, que se sabe que muestran una expresión alterada durante la enfermedad cardiovascular en relación con los sujetos que no padecen una enfermedad cardiovascular y durante el desarrollo.

5 De hecho, en una realización particular, los medios para su uso para llevar a cabo los métodos de la invención incluyen reactivos de PCR de los empleados en técnicas basadas en RT-PCR, y cuando se acoplan, enfoques de qPCR que pueden tener la ventaja de ser cuantitativos. La RT-qPCR se usa habitualmente para estudiar la expresión de ARNm.

10 También forma parte de la divulgación un kit para detectar los niveles de expresión de microARN en una muestra aislada de un sujeto, consistiendo dicho kit en medios para determinar los niveles de expresión de miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p. En una realización preferida, el kit comprende cebadores y sondas (marcadas opcionalmente con molécula que emiten fluorescencia) para amplificar y visualizar la amplificación de miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p en una PCR.

15 A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones, no se pretende que la palabra “comprender” y variaciones de la palabra excluyan otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra “comprender” engloba el caso de “que consiste en”. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20 **Ejemplo**

A. Características del sujeto y análisis de microARN. Análisis estadístico de datos experimentales

25 Para la evaluación de la posible contribución de la expresión de miARN a la predicción de la respuesta al tratamiento con CPAP en pacientes con apnea obstructiva del sueño (OSA) e hipertensión resistente (RH) pero sin hipersomnia incapacitante que requiere tratamiento urgente (escala de sueño de Epworth (ESS) ≤ 18), se obtuvieron muestras biológicas (plasma recogido en tubos con EDTA y anticoagulantes) de aquellos pacientes que se aleatorizaron a CPAP en un estudio HIPARCO (véase Martínez-García *et al.*, 2013, citado anteriormente).

30 La respuesta a CPAP se define como el cambio en la tensión arterial media (calculada por la diferencia inicial-final) de más de 4,5 mmHg.

35 Más en detalle, se identificaron 41 pacientes masculinos con OSA con RH de un ensayo de intervención prospectivo más grande de pacientes evaluados antes y después de 3 meses de tratamiento con CPAP con adhesión ($> 4,5$ horas/noche). La respuesta a CPAP se definió como cambios de TA $> 4,5$ mmHg. De los 41 pacientes, 20 mostraron una reducción en la TA media (media \pm DE, $11,5 \pm 5$ mmHg) (grupo que responde (RG o B en el presente documento)) y en 21 pacientes no se produjeron reducciones significativas en la TA media ($-1,5 \pm 4,7$ mmHg) (grupo que no responde (NRG o A en el presente documento)). Se aislaron los miARN del plasma en ayunas por la mañana de los 41 pacientes, y se obtuvo el perfil de expresión del miARN centrado en el sistema cardiovascular usando una matriz personalizada (Qiagen) seguido por verificación con qRT-PCR. Se ajustó un modelo de regresión logística para identificar los miARN que predicen la respuesta favorable de la TA. Se evaluaron la calibración, la discriminación, el índice de reclasificación neta y la validación cruzada.

45 Para el análisis de los niveles de microARN y la correlación con la respuesta/no respuesta a CPAP, los participantes se dividieron en tres grupos, dos grupos de 12 pacientes que se seleccionaron por ser aquellos con una muy buena respuesta a CPAP (grupo B), y aquellos con muy baja respuesta (pacientes que responden de manera extremadamente mala, grupo A) a CPAP; y un tercer grupo con el resto de pacientes. Los grupos de 12 miembros (de A y B) se usaron como cohorte de entrenamiento o como grupos simplificados para detectar las principales diferencias.

50 Posteriormente, se usó todo el tamaño de la muestra ($n = 41$) para la validación. El modelo obtenido se validó además usando pruebas estadísticas tal como se indica a continuación.

55 Tal como se indicó anteriormente, se determinó el perfil de expresión de cada miembro de miARN centrado en el sistema cardiovascular antes del tratamiento con CPAP con la matriz de PCR de miARN de enfermedad cardiovascular humana de Qiagen®, MIHS-113Z, que perfila la expresión de 84 miARN.

La siguiente tabla 1 muestra las características de grupos de 12 miembros de sujetos analizados para simplificación:

	A N = 12	B N = 12	p. global
Sexo:			$<0,001$
Mujer	0 (0,00%)	0 (0,00%)	
Hombre	12 (100%)	12 (100%)	
Accidente cerebrovascular	1 (8,33%)	1 (8,33%)	1,000
CHD	4 (33,3%)	2 (16,7%)	0,055

Antecedentes familiares	1 (8,33%)	1 (8,33%)	0,186
Diabetes	5 (41,7%)	6 (50,0%)	0,658
Dislipidemia	9 (75,0%)	9 (75,0%)	0,352
Menopausia	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0,001
Epworth > = 10	5 (41,7%)	4 (33,3%)	0,925
CVE anteriores	4 (33,3%)	3 (25,0%)	0,462
Patrón de TAS			0,631
Paciente con descenso nocturno de la tensión arterial	3 (25,0%)	5 (41,7%)	
Paciente sin descenso nocturno de la tensión arterial	6 (50,0%)	5 (41,7%)	
Paciente con aumento nocturno de la tensión arterial	3 (25,0%)	2 (16,7%)	
Diuréticos	10 (83,3%)	12 (100%)	0,233
Número de diuréticos	3,00 [3,00;4,00]	3,50 [3,00;4,00]	0,932
Tipo diurético			0,425
Ninguno	2 (16,7%)	0 (0,00%)	
Tiazidas/D.Xipamidas	5 (41,7%)	9 (75,0%)	
Diuréticos del asa sin tiazidas	4 (33,3%)	2 (16,7%)	
Pot.Sa/Anti-aldosterona	0 (0,00%)	0 (0,00%)	
Tiazidas y diuréticos del asa	1 (8,33%)	1 (8,33%)	
Tensión arterial media	113 [107;114]	116 [111;119]	0,383
Edad	63,0 [55,0;66,2]	55,0 [50,0;63,0]	0,266
Índice de masa corporal (IMC)	31,5 [30,1;34,0]	32,1 [30,5;37,9]	0,225
IMC > = 30	6 (75,0%)	9 (90,0%)	0,361
Perímetro del cuello	43,0 [42,0;46,0]	43,5 [41,8;46,0]	0,286
Epworth	8,50 [6,75;11,2]	8,00 [5,00;12,0]	0,826
Años desde el diagnóstico	12,5 [12,0;23,0]	9,00 [4,00;13,5]	0,096
CRP	1,35 [0,41;2,52]	0,88 [0,23;2,40]	0,446
Hemoglobina glucosilada	6,05 [5,57;6,35]	6,30 [5,55;6,80]	0,232
Colesterol total	194 [149;218]	192 [165;209]	0,944
Colesterol-HDL	39,0 [32,8;48,0]	49,0 [35,8;55,0]	0,436
Colesterol-LDL	125 [71,0;138]	108 [80,3;124]	0,837
AHI	34,5 [26,0;41,8]	45,0 [29,5;52,2]	0,731
AHI > = 30	8 (66,7%)	9 (75,0%)	0,802
CT90	6,00 [3,50;10,2]	7,00 [1,75;30,2]	0,583
Saturación media	93,0 [92,0;94,0]	90,5 [88,5;92,8]	0,119

Abreviaturas: CHD: cardiopatía coronaria; Epworth: Somnolencia diurna evaluada por el valor de la prueba de Epworth; TAS: tensión arterial sistólica; Pot.Sa/Anti-Aldosterona: aldosterona sérica en el síndrome de taquicardia postural ortostática. CRP: proteína C reactiva; AHI: índice de apnea-hipopnea; CT90: porcentaje de tiempo con saturación de oxígeno menor del 90%.

Con el fin de evaluar gráficamente las relaciones lineales y no lineales con el cambio en la tensión arterial media, se añadieron dos puntos de corte adicionales basándose en la mediana de valores observados en los grupos A y B, ampliando los intervalos de cambio en la tensión arterial media en intervalos $\leq 0,5$, (0,5,4,5], (4,5,11,5] y $> 11,5$.

5 Se evaluó la comparabilidad entre grupos mediante el uso de la prueba de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para la comparación de las características cuantitativas entre 2 y 3 grupos, respectivamente, y la prueba de Fisher para variables cualitativas (véase Hollander M, Wolfe DA (1973) Nonparametric Statistical Methods. Nueva York: John Wiley & Sons Páginas 68-75 (dos muestras), 115-120). Se ajustó un modelo de regresión logística para predecir la respuesta a CPAP dependiendo de los datos de pretratamiento (véase Hosmer DW, Lemeshow S (1989) Applied logistic regression. John Wiley & Sons. Páginas 8-10, 58, 60, 85-86). Aquellas variables que maximizaban la capacidad de discriminación del modelo, tal como se mide mediante AUC, se incluyeron en el modelo siempre que hubieran demostrado su contribución estadísticamente significativa según la prueba de razón de probabilidades (véase Hosmer DW, Lemeshow S (2013) Applied logistic regression. John Wiley & Sons. Páginas 12, 14-15, 18, 39-41, 86, 111, 114-115, 125, 231, 261-262, 276, 280, 295, 345, 350, 353). Los posibles puntos de corte para cada variable cuantitativa se seleccionaron de los que dividían la muestra en dos categorías con al menos 10 pacientes que respondían o que no respondían. Se usó la prueba de Hosmer-Lemeshow para evaluar la calibración del modelo de prueba y se usó el índice de reclasificación neta continua para decidir sobre la inclusión de esas variables sin una contribución estadísticamente significativa al modelo de regresión logística multivariante pero mejorando su AUC (véase Hosmer DW, Lemeshow S (1989) "Applied logistic regression". John Wiley & Sons, páginas 158-164, 204, 354; y 173-182, 206). El modelo final se tradujo a un sistema de puntuación fácil de usar (suma de valores de números enteros). Se estimaron la sensibilidad y la especificidad para cada posible punto de corte. Se usó la distribución binomial exacta para estimar los intervalos de confianza del 95% en las proporciones. Se usó un software R y un nivel de significación del 5%.

25 B. Análisis de los niveles de microARN para fines de predicción (predicción de respuesta al tratamiento con CPAP)

Para casi todos los miARN, la expresión entre los 6 pacientes que mejor responden es mayor que la expresión de los que no responden. El análisis de la expresión permitió identificar un subconjunto de miARN de 8 candidatos (miR.100.5p, miR.29a.3p, miR.144.3p, miR.150.5p, miR.7.5p, miR.378a.3p, miR.92a y miR.486.5p). Se seleccionó el SNORD95 de mantenimiento porque mostró la menor variabilidad. Este gen de mantenimiento se usó para estimar dCt para cada miARN según la fórmula (I)

$$dCt = Ct(miR) - Ct(SNORD95) (I)$$

A partir del análisis de los niveles de expresión de microARN en los grupos A y B de 12 miembros y validados adicionalmente en todos los pacientes (n = 41), los inventores concluyeron que los niveles de expresión de miR.100.5p podrían discriminar a los pacientes que responden de los que no responden en caso de que los sujetos fueran pacientes que responden extremadamente bien y que responden extremadamente mal a CPAP (con un área bajo la curva ROC del 91,7%, datos no mostrados). Estos datos se derivan, por ejemplo, a partir de la figura 2, obtenida del análisis de los valores de los 6 pacientes que peor responden y los 6 pacientes que mejor responden de los grupos de análisis de 12 miembros.

Además, tal como puede observarse a partir de las figuras 2 y 3 (diagramas de cajas para niveles de miR100.5p y niveles de miR.378a.3p para pacientes que no responden (A) y pacientes que responden (B)) en la relación entre la respuesta a CPAP y la expresión de miARN, hubo tendencias estadísticamente significativas en miR.378a.3p aparte de en miR.100.5p. Por tanto, ambos miARN mostraron menor dCt para aquellos pacientes con mayor respuesta a CPAP.

Para mejorar la sensibilidad y la especificidad y para obtener un modelo o método que permita la clasificación en el caso de que los pacientes que responden y los que no responden no respondan extremadamente bien o mal, los inventores concluyeron a partir del análisis de niveles de expresión de microARN, que combinaciones particulares de microARN eran buenos enfoques.

La figura 1 (paneles A a C) muestra diagramas de cajas para niveles de miR100.5p (como dCt miR100.5p), niveles de miR.378a.3p (como dCt miR.378a.3p) y niveles de miR.486.5p (como dCtmiR.486.5p), respectivamente, de las 41 muestras aisladas en relación con la respuesta a CPAP (expresada como intervalos de valores que indican grados de respuesta a CPAP). La figura 1 indica claramente que los niveles de los tres microARN observados juntos proporcionan información significativa. Los dos diagramas de cajas a la derecha de los gráficos (A) y (B) tienen una mediana de valores que son diferentes de un modo significativo a la mediana de valores de los dos diagramas de cajas a la izquierda de cada gráfico.

En el conjunto de entrenamiento, existe una correlación lineal estadísticamente significativa entre el cambio en la tensión arterial media y la expresión normalizada (dCt en referencia al SNORD95 de mantenimiento) de miARN 100.5p y 378a.3p. No existe una correlación lineal con la expresión normalizada de miARN 486.5p. Se muestra casi el mismo resultado basándose en el coeficiente de Spearman. dCt miARN 100.5p:

Correlación de Pearson, $r=-0,49$, valor de $p=0,014$

Correlación de Spearman, $s= -0,48$, valor de $p = 0,016$

dCt miRNA 378a.3p:

Correlación de Pearson, $r=-0,56$, valor de $p=0,007$

Correlación de Spearman, $s= -0,53$, valor de $p = 0,011$

dCt miRNA 486.5p:

Correlación de Pearson $r= 0,17$, valor de $p=0,414$

Correlación de Spearman $s= 0,19$, valor de $p = 0,387$

A pesar de la ausencia de una correlación lineal significativa para dCt miARN 486.5p, todos los puntos de corte definidos para estas expresiones de miARN en el nivel inicial (antes del tratamiento) mostraron una mediana de cambio positiva en la tensión arterial media superior a 10 mmHg, tal como se ilustra en la figura 5 (A a C), en la que el diagrama de cajas del cambio en la tensión arterial media (Δ TAM), con el cambio medido como la diferencia de la TAM inicial menos la TAM final se representa en relación con cada dCt miARN en el nivel inicial para los pacientes que responden y que no responden. Puede observarse en cualquiera de los gráficos que en el nivel inicial, los puntos de corte propuestos en los pacientes que no responden (caja de la izquierda en cada gráfico) mostraron un Δ TAM menor que en los que responden (caja a la derecha en cada gráfico). Las flechas indican la mediana de los valores.

La ventaja de la expresión normalizada de miARN 486.5p fue que no se correlacionó significativamente con la

expresión normalizada ni de miARN 100.5p ($r = -0,10$, $p = 0,63$) ni de miARN 378a.3p ($r = 0,05$, valor de $p = 0,84$). En cambio, las expresiones normalizadas de dCt miARN 100.5p y dCt miR 378a.3p están significativamente correlacionadas, con $r = 0,50$ y valor de $p = 0,017$. La importancia de dCt miARN 486.5p está respaldada por su contribución significativa al modelo una vez ajustado por dCt miARN 378a.3p (véase a continuación).

Los inventores determinaron valores discriminatorios para cada uno de los miR.378a.3p, miR.486.5p y miR.100.5p. Por tanto, la expresión de miR.378a.3p, determinada como un valor de dCt $<2,6$, fue estadísticamente significativa en el modelo univariante (sin procesar o no ajustado), con $p = 0,0052$. La expresión de miR.486.5p, determinada como valor dCt $> -7,1$, también fue estadísticamente significativa en el modelo univariante, con $p = 0,0327$. Finalmente, la expresión de miR.100.5p, determinada como valor de dCt $<0,4$, también fue estadísticamente significativa en el modelo univariante, con $p = 0,0327$.

Por tanto, con el análisis de estos tres marcadores, los sujetos pueden separarse según el nivel de respuesta a CPAP.

Se elaboró un modelo para predecir la respuesta a CPAP usando tanto los niveles de expresión de miR.378a.3p como los de miR.486.5p a partir de los datos presentados a un modelo de regresión logística ajustado (Hosmer DW, Lemeshow S (1989), citado anteriormente). El modelo con miR.378a.3p y miR.486.5p usado para predecir la respuesta a CPAP dio un AUC = 0,88, CI del 95% = [0,78, 0,98].

La siguiente tabla 2 muestra los criterios de discretización aplicados a los valores de dCT de miR.378a.3p y miR.486.5p y el modo de calcular una puntuación de probabilidad de respuesta (S). Además, se enumeran la probabilidad de respuesta predicha, así como la sensibilidad y la especificidad asociadas.

Tabla 2

Valores de dCt miARN	Puntuación de probabilidad (S)	de	Probabilidad predicha (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
486 \leq -7,2 y 378 $>$ 2,6	0		7,30	94,4	66,7
486 $>$ -7,2 y 378 $>$ 2,6	1		58,76	55,5	94,4
486 \leq -7,2 y 378 \leq 2,6	2		84,19	27,8	100,0
486 $>$ -7,2 y 378 \leq 2,6	3		98,97	0,0	100,0

La puntuación de probabilidad de respuesta (S) de desde 0 hasta 3 (es decir, la probabilidad de un cambio en la TA $>$ 4,5 mmHg) se calcula como:

$$S = 1^{*} + 2^{**}$$

en la que * significa que se añade 1 si dCtmiR.486.5p $>$ -7,2; y ** significa que se añade 2 si dCtmiR.378a.3p \leq 2,6, o lo que es lo mismo, que dCtmiR.486.5p $>$ -7,2 toma la puntuación discreta individual de 1 y se añade para calcularse en S; y dCtmiR.378a.3p \leq 2,6 toma la puntuación discreta individual del valor 2 y se añade para calcularse en S.

Si los valores de dCt de cada uno de miR.486.5p y miR.378a.3p, independientemente, no cumplen con los criterios de ser respectivamente $>$ -7,2 y \leq 2,6, no se añade ninguna puntuación discreta para ese miARN a la fórmula para calcular S.

La prueba de Hosmer-Lemeshow (tabla 2) no mostró una falta de ajuste estadísticamente significativa (valor de $p = 0,9996$). La probabilidad de respuesta a CPAP predicha es casi nula (estimada en 0,073) siempre que la expresión (cuantificada por dCt) de miR.486.5p no esté por encima de -7,2 y la expresión de miR.378a.3p sea de al menos 2,6, mientras que la probabilidad en el caso contrario se estimó en 0,990.

Además, el miR.100.5p mejoró significativamente el índice de reclasificación neta continua (NRI) en 0,7386, con un IC del 95% [0,124 – 1,3531] y un valor de p de 0,0185. El NRI se estima tal como se divulga en Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, D'Agostino RB Jr, Vasan RS, "Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond", Stat Med - 2008; 27 (2): 157-72; discusión 207-12. Además, la adición de miR.100.5p permitió alcanzar un AUC de 0,91, con un IC del 95% [0,82, 0,99] y sin ninguna falta significativa de ajuste (valor de p de la prueba HL = 0,99). Los datos que usan niveles con miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p se representan en la tabla 3. La tabla 3 muestra los datos recuperados de la prueba de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow para el modelo con miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p. La tabla 3 muestra también la relación entre la puntuación de probabilidad de respuesta a CPAP que puede calcularse a partir de la discretización de los valores de dCt de miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p con la probabilidad de respuesta predicha (en porcentaje). Una curva ROC correspondiente a estos resultados también se puede observar en la figura 4).

Tabla 3:

Puntuación de probabilidad de respuesta (S)	Probabilidad de respuesta predicha (%)
---	--

0	3,8
1	14,3
2	46,6
3	78,8
4	84,8
5	96,7
6	99,2

Traduciendo los coeficientes del modelo a una puntuación añadiendo 1 si dCtmiR.100.5p es < 0,4; 2 si dCtmiR.486.5p es > -7,1; y 3 si dCtmiR.378a.3p es < 2,6; podría simplificarse el uso del modelo a la vez que se mantiene exactamente el mismo orden de sus probabilidades predichas.

5 Por tanto, la puntuación de probabilidad de respuesta de desde 0 hasta 6 (es decir, probabilidad de un cambio en la TA > 4,5 mmHg) en el modelo con tres miRNA se calcula como:

$$S = 1^* + 2^{**} + 3^{***};$$

10 en la que * significa que se añade 1 si dCtmiR.100.5p < 0,4, ** significa que se añade 2 si dCtmiR.486.5p > -7,1 y *** significa que se añade un 3 si dCtmiR.378a.3p <= 2,6.

15 Igual que antes para el modelo con dos miRNA, si los valores de dCT de cada uno de miR.100.5p, miR.486.5p y miR.378a.3p, independientemente, no cumplen los criterios de ser respectivamente < 0,4, > -7,1 y <= 2,6, no se añade ninguna puntuación discreta para ese miRNA a la fórmula para calcular S.

20 La tabla 4 muestra la sensibilidad y la especificidad de la regla de decisión basándose en cada posible punto de corte de la puntuación (S).

Tabla 4.

Puntuación de probabilidad de respuesta (S)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Desde 1 hasta 6	100,0	50,0
Desde 2 hasta 6	94,1	66,7
Desde 3 hasta 6	70,6	88,9
Desde 4 hasta 6	58,8	94,4
Desde 5 hasta 6	29,4	100

25 Si la probabilidad de respuesta a CPAP entre pacientes con hipertensión resistente es del 50%, al tratar sólo a aquellos con una puntuación > 0, puede ahorrarse un 50% esperado de tratamientos innecesarios, sin coste ya que la sensibilidad se estima en el 100%. Teniendo en cuenta la incertidumbre introducida por el tamaño de la muestra, se estimó un intervalo de confianza del 95% (IC del 95%) para la falta de especificidad y sensibilidad que ha de esperarse en la población mediante el uso de la distribución binomial exacta. Por tanto, dada la especificidad del 50% y la sensibilidad del 100% obtenida en la muestra, se espera mediante la aplicación de la puntuación que, con una confianza del 95%, se ahorrarán entre el 26% y el 74% de tratamientos innecesarios, y entre el 0% y el 20% de los pacientes que se beneficiarían del tratamiento con CPAP no recibirán un tratamiento equivocado.

35 Puesto que el tratamiento con CPAP se administra realmente a todos debido a su seguridad y beneficio potencial para pacientes con hipertensión resistente, reducir la cantidad de pacientes tratados innecesariamente al 50% (con un intervalo de confianza del 95% de entre el 26 y el 74%), a la vez que se mantiene una sensibilidad del 100% (con un intervalo de confianza del 95% de entre el 80 y el 100%) cuando se identifica quién se beneficiará o no de este tratamiento, es una buena propiedad de la presente invención. Por tanto, los pacientes falsos positivos (que inicialmente se clasificarían como responden y que no están al final) no representan ningún inconveniente, puesto que en la actualidad todos los pacientes con RH se tratan con CPAP. Por tanto, si pueden evitarse el 50% de los tratamientos no útiles, esto supone una ventaja real.

45 Los datos de los ejemplos permiten concluir que puede usarse cualquiera de los niveles de miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p en una muestra aislada de un sujeto como marcadores para predecir la respuesta a CPAP en un sujeto que lo necesita, con alta sensibilidad y especificidad. Adicionalmente, combinaciones particulares de estos marcadores mejoran la sensibilidad del método para predecir la respuesta a CPAP, o incluso representan métodos universales, puesto que permiten una buena clasificación independientemente del grado de respuesta o no respuesta a CPAP.

50 Además se propone un método que puede aplicarse fácilmente en clínicas, debido a la posibilidad de puntuar los niveles del microARN, dando por tanto un valor que indica o se correlaciona con la probabilidad de respuesta. Este valor puede ayudar al médico a recomendar o no un tratamiento con CPAP evitando costes y situaciones incómodas y no eficaces para los pacientes.

Bibliografía citada en la solicitud

- 5 - Martinez-Garcia *et al.*, "Effect of CPAP on Blood Pressure in Patients With Obstructive Sleep Apnea and Resistant Hypertension", *Journal of American Medical Association*- 2013, vol. n.º 310(22), págs.: 2407-2415.
- Lewis *et al.*, "Early predictors of CPAP Use for the Treatment of Obstructive Sleep Apnea", *Sleep*-2004, vol. n.º 1, págs.: 134-138
- 10 - Small *et al.*, "MicroARN add a new dimension to Cardiovascular Disease", *Circulation*-2010, vol. n.º 121, págs.: 1022-1032
- Burtis C.A. *et al.*, 2008, capítulo 14, sección "Statistical Treatment of Reference Values"
- Documento WO2012083004
- 15 - Documento WO2012065113
- Da Costa el at., "MicroARNs in control of cardiac hypertrophy", *Cardiovascular Research*-2012, vol. n.º. 93, págs.: 563-572
- 20 - Hollander M, Wolfe DA (1973) *Nonparametric Statistical Methods*. Nueva York: John Wiley & Sons. Páginas 68-75 (dos muestras), 115-120.
- Hosmer DW, Lemeshow S (1989) *Applied logistic regression*. John Wiley & Sons. Páginas 8-10, 58, 60, 85-86
- 25 - Hosmer DW, Lemeshow S (1989) *Applied logistic regression*. John Wiley & Sons, Páginas 158-164, 204, 354; y 173-182, 206.
- Hosmer DW, Lemeshow S (2013) *Applied logistic regression*. John Wiley & Sons. Páginas 12, 14-15, 18, 39-41, 86, 111, 114-115, 125, 231, 261-262, 276, 280, 295, 345, 350, 353.
- 30 - Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, D'Agostino RB Jr, Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med*. 2008;27(2):157-72; discusión 207-12.
- 35

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para predecir la respuesta a presión positiva continua en las vías respiratorias (CPAP) en un sujeto con apnea obstructiva del sueño (OSA) e hipertensión resistente, comprendiendo el método determinar en una muestra aislada del sujeto el nivel de expresión de un microARN relacionado funcionalmente con el sistema cardiovascular y relacionado con enfermedad cardiovascular, seleccionándose dicho microARN del grupo que comprende miR.100.5p o miR.378a.3p, o cualquier combinación de los mismos, en el que la respuesta se define en lo que se refiere a TA (tensión arterial), y en el que la respuesta a presión positiva continua en las vías respiratorias es una disminución de la tensión arterial media (TAM) de al menos 4,5 mm Hg en relación con la tensión arterial media inicial antes del tratamiento.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión de microARN se detecta mediante PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa y se expresa como un valor de dCT calculado según la fórmula (I),
- $$dCT = Ct \text{ microARN} - Ct \text{ gen de mantenimiento (I)}$$
- en la que:
- Ct es un umbral de ciclo, identificado como el número de ciclos en el ensayo de PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa requerido para que una señal fluorescente usada en el mismo exceda un umbral predeterminado;
 - Ct microARN son los niveles de umbral de ciclo de microARN de interés;
 - Ct gen de mantenimiento indica los niveles de umbral de ciclo de un gen de mantenimiento; y
 - dCt es la diferencia entre los niveles de umbral de ciclo de microARN, en la escala logarítmica de base 2, y el nivel de umbral de ciclo de un ARN de mantenimiento, en la escala logarítmica de base 2.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende determinar el nivel de expresión de miR.100.5p.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende determinar el nivel de expresión de miR.378a.3p y el nivel de expresión de miR.486.5p.
5. Método según la reivindicación 4, que comprende determinar el nivel de expresión de miR.100.5p, miR.378a.3p y miR.486.5p.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se determinan al menos los niveles de expresión de dos miARN, y el método comprende:
- a. calcular una puntuación de probabilidad (S) de respuesta a CPAP que resulta de la suma de puntuaciones discretas individuales dadas a los niveles de expresión de cada microARN; y
 - b. determinar que el sujeto responderá a CPAP si la puntuación de probabilidad está dentro de un intervalo de puntuaciones de probabilidad indicativas de respuesta.
7. Método según la reivindicación 6, en el que los niveles de expresión de miR.378a.3p y de miR.486.5p se determinan mediante PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa y se expresan como un valor de dCT según la fórmula (I) según la reivindicación 2; y se calcula una puntuación de probabilidad (S) de respuesta a CPAP a partir de la suma de las puntuaciones discretas individuales dadas a los niveles de expresión de miR.378a.3p y de miR.486.5p, siendo dichas puntuaciones discretas individuales dadas a los niveles de expresión de cada microARN según los siguientes criterios:
- a. añadir 1 si los niveles de miR.486.5p, expresados como un valor de dCT según la fórmula (I), son mayores que un valor de dCT de control de referencia;
 - b. añadir un 2 si los niveles de miR.378a.3p, expresados como un valor de dCT según la fórmula (I), son menores que o iguales a un valor de dCT de control de referencia;
- y en el que una puntuación de probabilidad (S) de desde 2 hasta 3 es indicativa de respuesta a CPAP.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el valor de control de referencia para los niveles de miR.486.5p es un valor de dCT de -7,2 y el valor de control de referencia para los niveles de miR.378a.3p es un valor de dCT de 2,6, calculándose los valores de dCT según la fórmula (I) en la que el gen de mantenimiento es

SNORD 95.

- 5 9. Método según la reivindicación 6, en el que los niveles de expresión de miR.100.5p, de miR.378a.3p y de miR.486.5p se determinan mediante PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa y se expresan como un valor de dCT según la fórmula (I) según la reivindicación 2; y se calcula una puntuación de probabilidad (S) de respuesta a CPAP a partir de la suma de las puntuaciones discretas individuales dadas a los niveles de expresión de miR.100.5p, de miR.378a.3p y de miR.486.5p, siendo dichas puntuaciones discretas individuales dadas a los niveles de expresión de cada microARN según los siguientes criterios:
- 10 a. añadir 1 si los niveles de miR.100.5p, expresados como un valor de dCT según la fórmula (I), son menores que un valor de control de referencia;
- 15 b. añadir un 2 si los niveles de miR.486.5p, expresados como un valor de dCT según la fórmula (I), son mayores que un valor de control de referencia; y
- c. añadir un 3 si los niveles de miR.378a.3p, expresados como un valor de dCT según la fórmula (I), son menores que un valor de referencia;
- 20 y en el que una puntuación de probabilidad (S) de desde 4 hasta 6 es indicativa de respuesta a CPAP.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el valor de control de referencia para los niveles de miR.100.5p es un valor de dCT de 0,4; el valor de control de referencia para los niveles de miR.486.5p es un valor de dCT de -7,1 y el valor de control de referencia para los niveles de miR.378a.3p es un valor de dCT de 2,6, calculándose los valores de dCT según la fórmula (I) en la que el gen de mantenimiento es SNORD 95.
- 25 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra aislada se selecciona del grupo que consiste en sangre, saliva, lavado broncoalveolar y orina.
- 30 12. Uso de medios para detectar la expresión de un microARN en una muestra aislada de un sujeto, seleccionándose dichos medios del grupo que consiste en reactivos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y/o reactivos de transferencia de tipo Northern para predecir la respuesta al tratamiento con presión positiva continua en las vías respiratorias (CPAP) en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

35

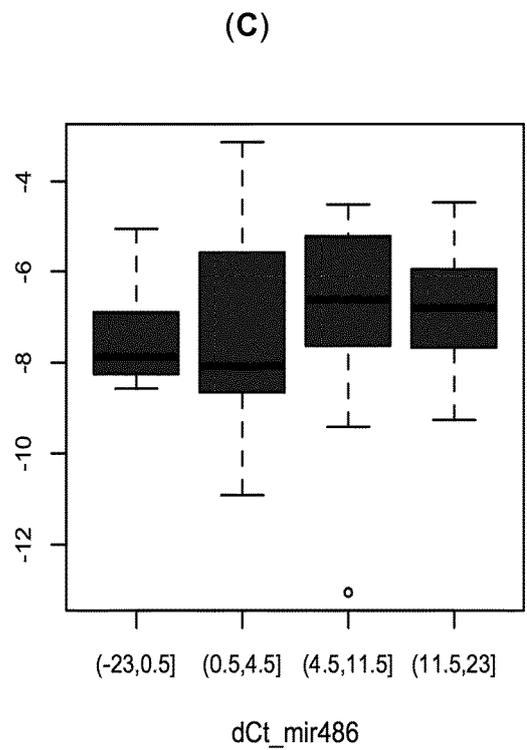
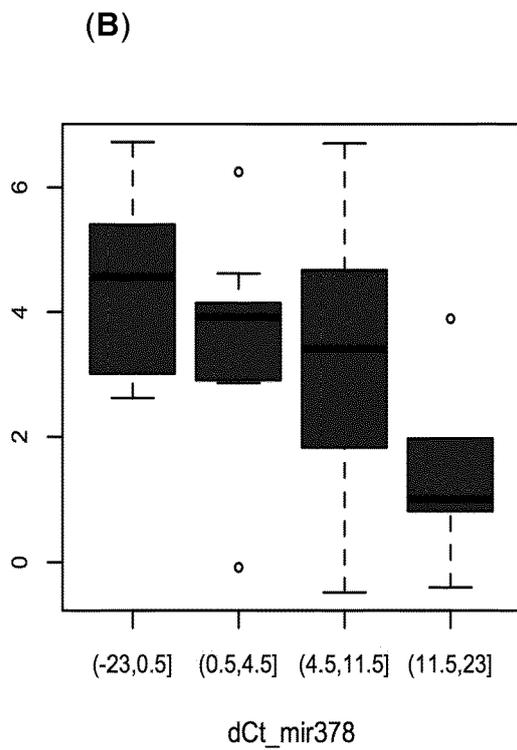
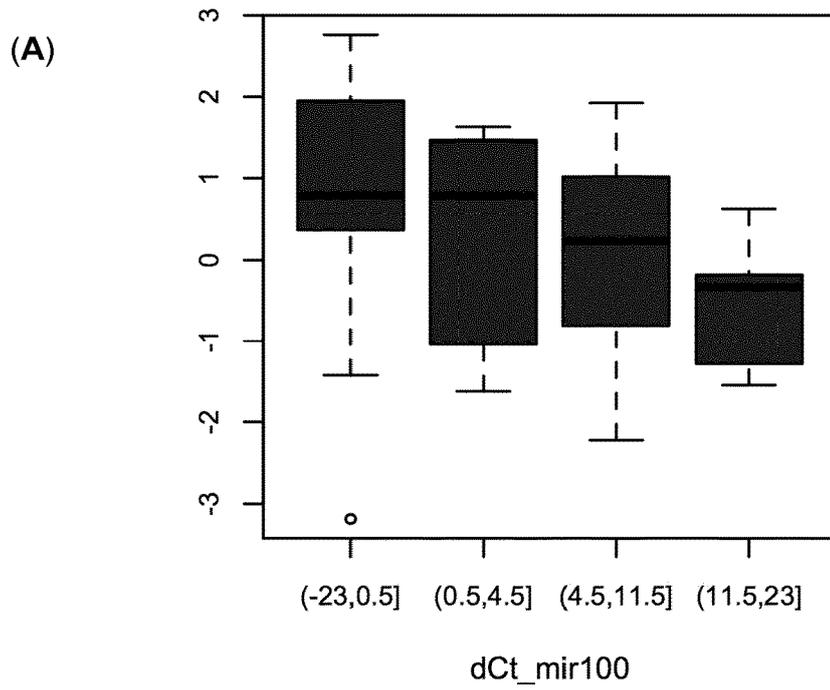


FIG. 1

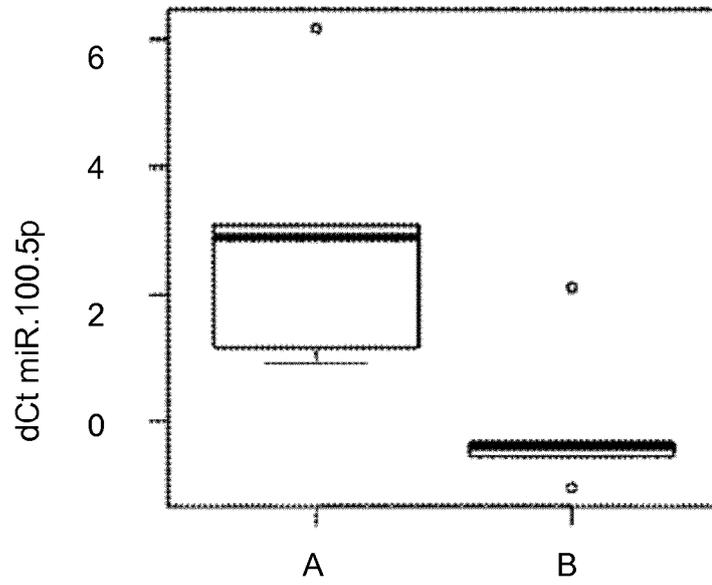


FIG. 2

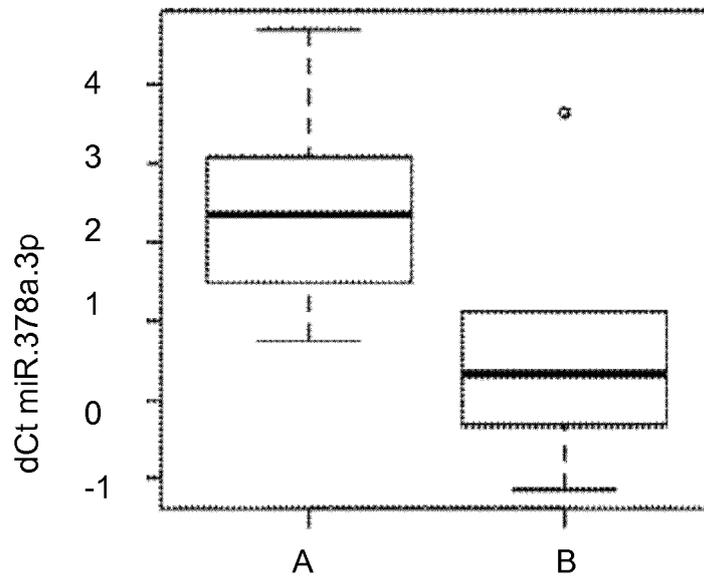


FIG. 3

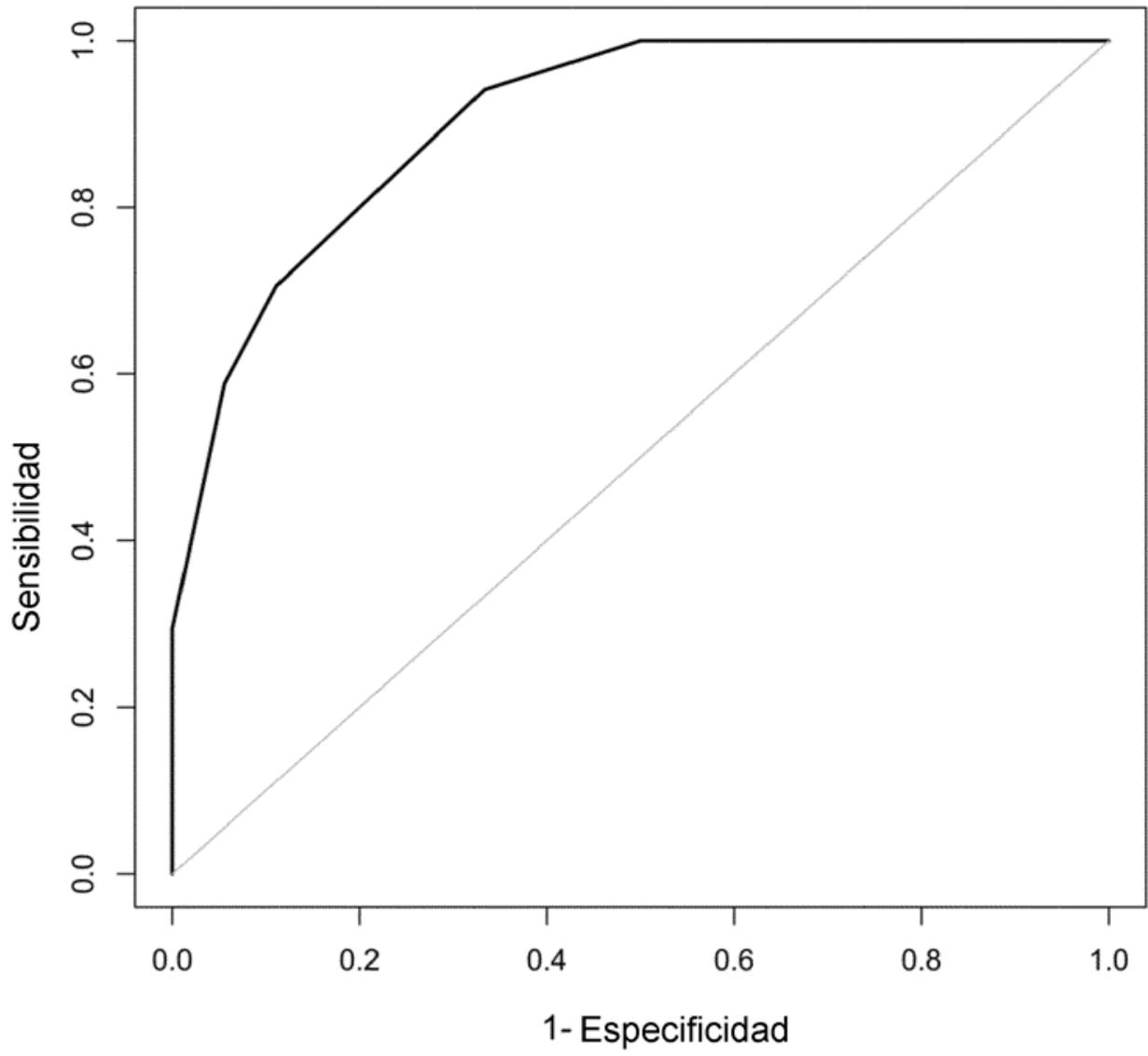
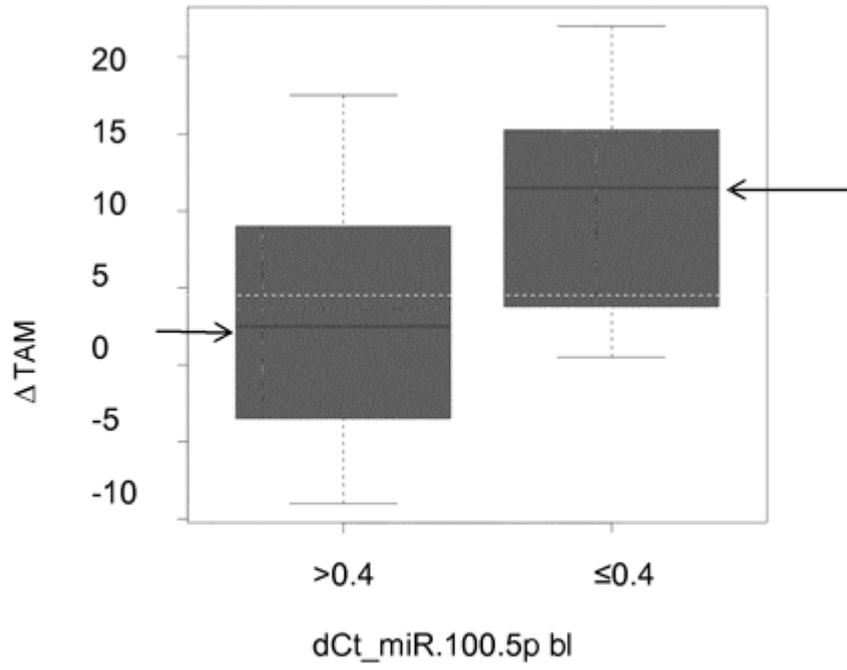


FIG. 4

(A)



(B)

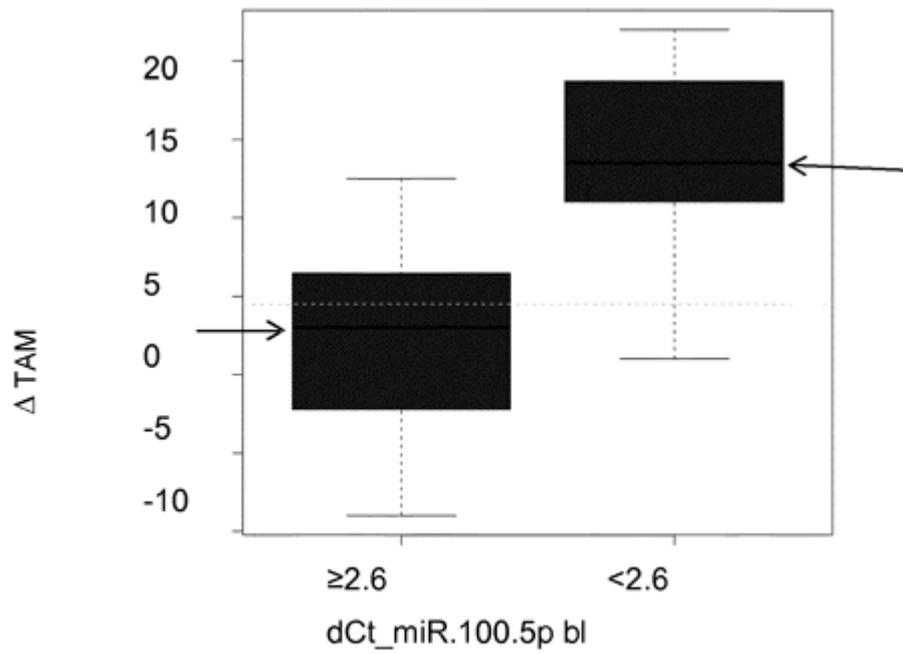
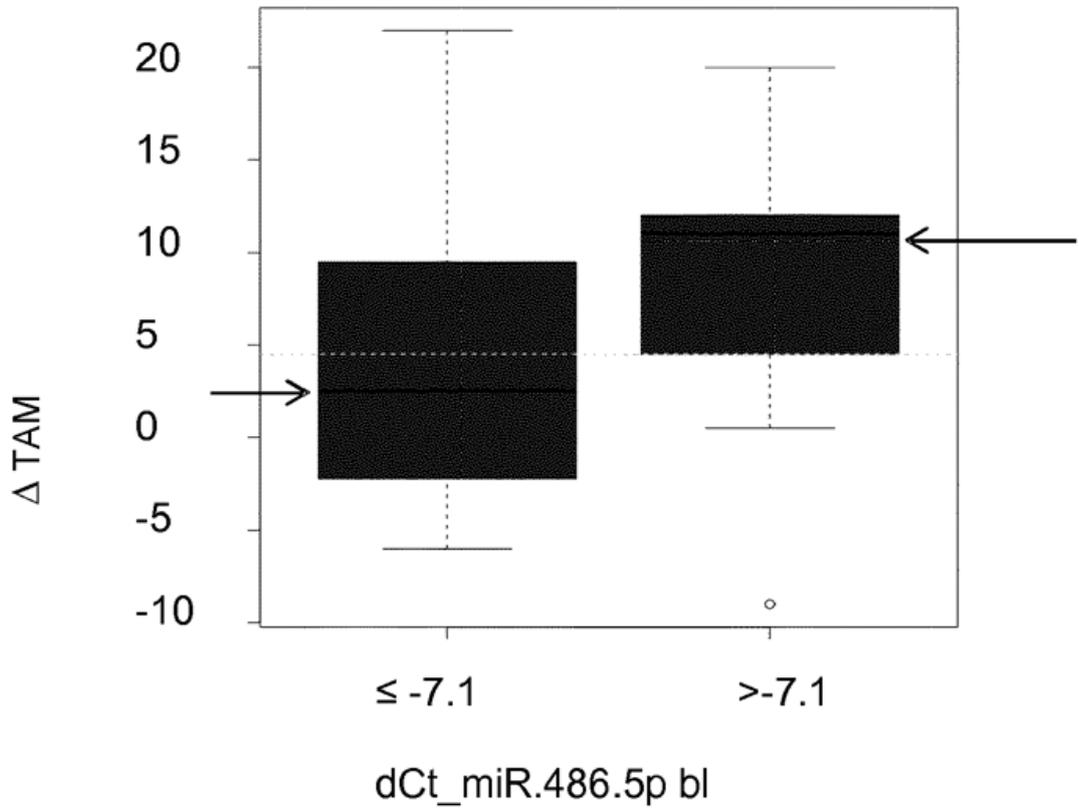


FIG. 5

(C)



Cont FIG. 5