

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 481**

21 Número de solicitud: 202230294

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

A61P 3/06 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

31.03.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.11.2023

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

27.09.2024

Fecha de concesión:

29.10.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.11.2024

73 Titular/es:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (45.0%)

Avenida de la Constitución 18

41071 Sevilla (Sevilla) ES y

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (55.0%)

72 Inventor/es:

TORO CEBADA, Rocio;

MANGAS ROJAS, Alipio y

BONET MARTÍNEZ, Fernando

74 Agente/Representante:

SAN MARTÍN ALARCIA, Esther

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **Biomarcadores y método para la detección de intolerantes a estatinas en pacientes con riesgo cardiovascular**

57 Resumen:

Biomarcadores que permiten diagnosticar la intolerancia a estatinas en pacientes con riesgo cardiovascular, constituido por un panel de miARNs y variables clínicas, método para la detección de intolerantes a estatinas, kit o dispositivo y usos.

ES 2 953 481 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores y método para la detección de intolerantes a estatinas en pacientes con riesgo cardiovascular

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Medicina, y se refiere a biomarcadores y a un método para la detección de intolerantes a estatinas en pacientes con riesgo cardiovascular.

10

ESTADO DEL ARTE

La enfermedad cardiovascular es un término empleado para los problemas del corazón y los vasos sanguíneos. La causa fundamental de la enfermedad cardiovascular es la aterosclerosis, afección que ocurre cuando el colesterol se acumula en las paredes de los vasos sanguíneos.

15

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de muerte a nivel mundial según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) referidos a 2019, donde se señala que concretamente es la cardiopatía isquémica la mayor causa de defunción, siendo responsable del 16% del total de muertes en el mundo (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>).

20

La enfermedad cardiovascular arterioesclerótica (ECVA) es un componente importante de la enfermedad cardiovascular (ECV), que es responsable de más de 4 millones de muertes anuales en Europa (Mach et al. 2020). La ECV también es la causa más común de muerte a escala mundial. Las dos formas más comunes de ECV son la enfermedad coronaria e ictus isquémico, que causan el 45% de todas las muertes anuales en Europa: 49% de muertes en mujeres, 40% de muertes en hombres y más de 1,4 millones de muertes prematuras en personas <75 años (Townsend, N. et al. 2016).

25

30

En España la enfermedad cardiovascular es la causa más frecuente de muerte por delante del cáncer, y la hipercolesterolemia supone 54% del riesgo potencial de padecer un infarto agudo de miocardio (IAM) (Yusuf, S., et al 2004; datos del Instituto Nacional de Estadística: <https://www.ine.es/> de Abril 2020 y de la Fundación Española del Corazón.

35

<https://fundaciondelcorazon.com/corazon-facil/blog-impulso-vital/2208-cuanto-cuesta-enfermo-cardiovascular.html>).

5 La enfermedad cardiovascular constituye por tanto la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo y resulta especialmente relevante en el mundo occidental donde su prevalencia frente a otras causas de muerte es mucho más acentuada, generando a su vez un enorme coste económico en el sistema de salud.

10 Los niveles plasmáticos de lípidos de baja densidad (colesterol LDL o LDLc) son el principal factor causal de estos eventos vasculares. Frente a ellos, las estatinas o inhibidores de la enzima hidroximetilglutaril-CoA-reductasa, son la piedra angular de la prevención primaria y secundaria de las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas en todo el mundo.

15 Basándose en la evidencia de los ensayos clínicos, la *European Society of Cardiology (ESC)/ European Atherosclerosis Society (EAS)* en sus "Directrices sobre el manejo de dislipidemias" de 2016 y 2019 (<https://www.escardio.org/Guidelines/Clinical-Practice-Guidelines/Dyslipidaemias-Management-of>) han establecido objetivos de LDLc o una reducción de la concentración de LDLc del 50% en pacientes de alto y muy alto riesgo cardiovascular para reducir los eventos vasculares.

20 Aunque la mayoría de los ensayos han demostrado una reducción notable, del 22 % de los eventos vasculares mayores tras cinco años de tratamiento con estatinas (Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration, et al., 2020) casi el 80 % de los pacientes tratados no alcanzan el LDLc recomendado, debido a la baja adherencia a la terapia.

25 Esta baja adherencia a la terapia se debe a varias causas, entre ellas razones culturales, el precio del tratamiento, los efectos secundarios y la falta de información sobre su efectividad (Banach M. et al., 2016).

30 Aunque las estatinas son en general bien toleradas, la principal causa de la falta de adherencia al tratamiento son precisamente los efectos adversos derivados de la intolerancia a las estatinas, siendo la responsable de la falta de adherencia en los pacientes con riesgo cardiovascular hasta en un 15% de los casos (Stulc T. et al., 2015; Guyton J.R. et al., 2014; Wai M.Y. et al., 2013).

La Agencia Europea del Medicamento (EMA) define en sus “Directrices sobre investigación clínica de medicamentos en el tratamiento de trastornos de lípidos” (*Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment of lipid disorders*; http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/01/WC500159540.pdf) la intolerancia a las estatinas como la incapacidad de tolerar al menos dos o más estatinas en la dosis diaria más baja aprobada, debido al desarrollo de efectos secundarios que comenzaron o aumentaron durante el tratamiento con estatinas y cesaron cuando se suspendieron las estatinas.

10 La intolerancia a las estatinas (SI, por sus siglas en inglés) presenta síntomas relacionados con sintomatología muscular (SAMS), siendo la causa más frecuente de falta de adherencia y/o suspensión del tratamiento con estatinas (Rosenson, R. S., 2014; Guyton J.R. et al., 2014; Wai M.Y. et al., 2013).

15 Se han descrito cuatro formas de SAMS: mialgia, miopatía, miositis y rabdomiólisis. Las mialgias o dolores musculares, sin elevación de la creatina quinasa ni pérdida funcional importante, son generalmente autoreportadas y constituyen el 7-29% de los casos; las miopatías son el efecto adverso más común; las miositis son inflamaciones musculares con elevación de la concentración de la enzima creatina quinasa; y finalmente, las rabdomiólisis
20 implican un daño muscular grave y son el síntoma más severo, estimadas en 1-3/100000 pacientes/año.

El problema para diagnosticar intolerancia a las estatinas es la ausencia de biomarcadores o test diagnósticos que determinen los individuos que la padecen, así como la variabilidad de
25 diseño de los estudios observacionales, que no han llegado a ninguna conclusión determinante. El impacto de esta condición en las tasas de eventos cardiovasculares después de abandonar la terapia con estatinas conduce a la necesidad de identificar un biomarcador novedoso y accesible que identifique esta población (Zhang H, et al., 2017).

30 Hasta la fecha, la detección de la intolerancia a las estatinas se basaba en la presencia de niveles anormales de ciertos marcadores del funcionamiento del hígado o de los músculos como el exceso de creatina quinasa. Este biomarcador resulta de utilidad únicamente en caso que haya lisis del musculo, lo cual resulta claramente insuficiente, ya que parte de la sintomatología adversa derivada de la intolerancia a las estatinas no se ve mediada por el
35 aumento de la creatina quinasa.

Estudios previos señalan la necesidad de encontrar biomarcadores útiles para la determinación de la intolerancia a las estatinas, como en la WO2009106838A1, donde se estudia la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1.

5 Algunos de estos estudios apuntan a los niveles en sangre periférica de microARN específicos musculares como potenciales biomarcadores para predecir la toxicidad músculo esquelética inducida por estatinas (Takeshi H. et al, 2020), pero sin llegar a conclusiones claras sobre el papel de los mismos en los tratamientos con estatinas y sin aportar estudios experimentales que lo justifiquen.

10

Otros estudios apuntan a una amplia variedad de efectos de la aplicación de estatinas en el nivel de expresión de algunos miARNs, sin una relación unívoca entre la presencia de estatinas y su sobreexpresión o infraexpresión (Zambrano T. et al., 2018), sin llegar a establecer ninguna relación directa entre estos niveles de miARNs y la eficacia o toxicidad de las estatinas (Ubilla C.G. et al., 2021; Shun S. et al., 2017;) y sin conocer las vías involucradas (Arrigoni, E. et al., 2017).

15

En ninguno de estos casos se relaciona de forma clara los efectos miopáticos de las estatinas y los niveles circulantes de miARNs, ni se proponen candidatos serios entre los miARNs como potenciales biomarcadores de la intolerancia a estatinas.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Proponemos como biomarcadores que permiten diagnosticar al paciente con intolerancia a estatinas un panel constituido por miARNs y variables clínicas.

25

Además de evitar el abandono del tratamiento debido a los efectos secundarios derivados, la identificación de esta intolerancia permite definir qué pacientes con riesgo cardiovascular son candidatos para tomar fármacos hipolipemiantes, evitando así el uso de las estatinas en esos casos y optando por otras alternativas como los inhibidores anti-PCSK9. Debe tenerse en cuenta que todos los pacientes sometidos a un tratamiento con estatinas están bien en prevención primaria (en riesgo, sin evento) o en prevención secundaria (han sufrido un evento cardiovascular tipo accidente vasculocerebral, vasculopatía o enfermedad coronaria), teniendo estos últimos un riesgo cardiovascular mayor.

35

Se trata por tanto de un diagnóstico simple basado en variables clínicas tomadas en el día a día y miARNs.

5 Los miARNs son biomarcadores que se están utilizando en diferentes campos, tales como la oncología, por sus características de estabilidad, presencia en fluidos biológicos, y porque proporcionan información de la regulación epigenética, los procesos metabólicos, o la reparación de tejidos.

10 Los microARNs (miARN) son pequeños ARN no codificantes con unos 18-25 nucleótidos de longitud capaces de modular la expresión de los ARN mensajeros complementarios emparejándose con la región no traducida (3'-UTR) (David P, B., 2004) y han sido identificados como importantes reguladores de genes involucrados en varios procesos biológicos.

15 Los microARNs son ARNs monocatenarios no codificantes con cierta estructura secundaria que regulan negativamente (inhiben) la expresión génica bien por inhibición de la traducción o escisión del ARN mensajero (*mARN*). Por lo tanto, los miARNs son reguladores post-transcripcionales que se unen a secuencias complementarias de los transcritos de *mARN*, lo que generalmente produce una represión de la traducción o la degradación del objetivo que
20 tiene como consecuencia el silenciamiento de genes.

Bajo un sistema de nomenclatura estándar, los nombres se asignan a los miARNs confirmados experimentalmente de la siguiente manera: el prefijo "mir" es seguido (por un guión y) un número, por lo que este último puede indicar el orden de los nombres.

25 El "*mir*-" sin capitalizar se refiere al pre-miARN, mientras que un "*miR*-" en mayúscula se refiere a la forma madura. Los miARNs con secuencias casi idénticas, excepto uno o dos nucleótidos, se anotan con una letra minúscula adicional, por ejemplo miR-99a. Los pre-miARNs que conducen a un 100% de miARNs maduros idénticos pero que están ubicados
30 en diferentes lugares en el genoma se indican con un sufijo adicional de número de guión. Las especies de origen pueden designarse con un prefijo de tres letras, por ejemplo, hsa-miR-223 es un miARN humano (*Homo sapiens*). Dado que, en el contexto de este documento, todos los miARNs individualizados son miARNs humanos, el prefijo "*hsa*-" a veces se omite. Cuando dos miARNs maduros se originan en brazos opuestos del mismo
35 pre-miARN, se denotan con un sufijo -3p o -5p, como por ejemplo miR-142-3p. Cuando se conocen los niveles de expresión relativos, un asterisco después del nombre indica un

miARN expresado en niveles bajos en relación con el miARN en el brazo opuesto de una horquilla. La mayoría de los genes miARN conocidos se encuentran en regiones intergénicas u orientadas de forma antisentido a los genes vecinos y, por lo tanto, se cree que se transcriben como unidades independientes. Sus genes generalmente se transcriben mediante la ARN polimerasa II, y las transcripciones se procesan, se exportan desde el núcleo y se procesan posteriormente mediante mecanismos específicos, como es bien conocido en la técnica (ver, por ejemplo, He et al., 2004).

Se puede acceder a las secuencias de miARN en <http://www.mirbase.org>.

10 Sus propiedades los convierten en los ARN extracelulares más estudiados como marcadores diagnósticos y terapéuticos en el campo cardiovascular (Stepień E., 2018; Lu D. et al., 2019).

15 La utilización de miARNs como biomarcadores periféricos permite, según el método de la presente invención, identificar la población intolerante a las estatinas y así personalizar el tratamiento de la dislipidemia (niveles altos de lípidos en sangre) en estos pacientes con riesgo cardiovascular.

20 Proponemos un panel de miARN circulantes para discriminar individuos intolerantes a estatinas y no intolerantes a estatinas.

Así, se empleará el término “*miARN de la invención*” para referirnos a cualquier miARN seleccionado del grupo formado por let-7c-5p (SEQ ID No.1), let-7d-5p (SEQ ID No.2), let-7f-5p (SEQ ID No.3), miR-376a- 3p (SEQ ID No.4), y miR-376c-3p (SEQ ID No.5).

El conjunto de los miARNs let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p presentan una capacidad diagnóstica del 0.936 (95% CI: 0.887–0.985; p <0.001).

30 Ello, junto a variables clínicas tales como años de dislipidemia (DLP), la presencia de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD), la hipertensión arterial , y los niveles de colesterol no HDL incrementan marcadamente su potencial diagnóstico.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso *in vitro* de los niveles de expresión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y/o miR-376c-3p, o cualquiera de sus combinaciones, como biomarcadores para discriminar individuos intolerantes a estatinas

y no intolerantes y por tanto, para predecir o pronosticar la aparición de efectos adversos como respuesta al tratamiento con estatinas en individuos con riesgo cardiovascular.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, los biomarcadores se usan simultáneamente.

En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, los biomarcadores que se usan simultáneamente son let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3.

10 En **otro aspecto** de la invención, los biomarcadores let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y/o miR-376c-3p o cualquiera de sus combinaciones constituyen perfiles de expresión por si solos, o junto a variables clínicas como años de dislipidemia, la presencia de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD), la hipertensión arterial y/o los niveles de no HDL-c.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, los biomarcadores let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p se utilizan en combinación y las variables clínicas seleccionadas son los años de dislipidemia y/o los niveles de colesterol no HDL.

20 En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, los biomarcadores let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p se utilizan en combinación y las variables clínicas seleccionadas son los años de dislipidemia y los niveles de colesterol no HDL.

Métodos de la invención

25 Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con estatinas en individuos con riesgo cardiovascular, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- 30 a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,
b) cuantificar los niveles de expresión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente el primer método de la invención además comprende:

- 35 c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Aún más preferiblemente se cuantificará la cantidad de producto de expresión de todos simultáneamente.

5 Aún más preferiblemente se cuantificará la cantidad de producto de expresión de let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p simultáneamente.

En otra realización preferida, los pasos (b) y/o (c) pueden ser total o parcialmente automatizados.

10 Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir o pronosticar la tolerancia/no tolerancia a las estatinas en individuos con riesgo cardiovascular, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) - (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

15 d) asignar al individuo que presenta en un análisis, antes de administrarle el tratamiento con estatinas, los niveles de expresión de *let-7c-5p*, *let-7d-5p*, *let-7f-5p*, *miR-376a-3p* y/o *miR-376c-3p* sobreexpresados, con respecto a los valores medios de un individuo normal, al grupo de pacientes que va a sufrir efectos adversos derivados del tratamiento con estatinas.

20 Una "muestra biológica" tal como se define aquí, es una pequeña parte de un sujeto, representativa del conjunto. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica se selecciona de entre sangre, plasma y suero. En una realización aun más preferida la muestra biológica es plasma.

25 El primer método de la invención implica la comparación de dichos niveles de miARNs con los niveles de dichos miARNs de una muestra de referencia o con un valor mediano. En el contexto de la presente invención, se entiende por "*muestra de referencia*" la muestra que se usa para determinar la variación de los niveles de expresión de los miARNs de la presente invención. En una realización preferida, el valor de referencia se obtiene de los valores de expresión obtenidos de una muestra con individuos que no tienen intolerancia a las estatinas.

30 Preferiblemente, se toman muestras de referencia de varios individuos que no tienen intolerancia a las estatinas y se combinan, de modo que el valor de referencia refleje el valor medio de dichas moléculas en la población de individuos que no padecen intolerancia a las

estatinas. "*Valor de referencia*" es el nivel de expresión de un miARN de la invención en una muestra de referencia.

5 La detección la cantidad de producto de expresión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y/o miR-376c-3p, puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Los niveles de expresión van a dar un determinado perfil. El término "nivel de expresión", también denominado "cantidad producto" o "cantidad de producto de expresión" se refiere al material bioquímico, en concreto miARN.

10 La medida de la cantidad o la concentración de producto de expresión preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión, está correlacionada directamente con el número de moléculas de ARN. Dicha señal (a la que también podemos referirnos como señal de intensidad) puede
15 obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiqueta" o productos de reacción enzimática).

20 El término "cantidad", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los productos de expresión, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de dichos productos de expresión obtenidos mediante
25 medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita,
30 a la comparación de la cantidad de los productos de expresión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p, de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de los productos de expresión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p de una o varias muestras de referencia deseable. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o
35 consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. El cálculo descrito en el

apartado (b) del método de la presente invención puede ser realizado manualmente o asistido por ordenador.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el resultado se puede obtener mediante cualquiera de las siguientes técnicas:

- 5 (i) un método de generación de perfiles de miARN, como un microarray, y/o
- (ii) un método que comprende PCR (reacción en cadena de la polimerasa), tal como PCR en tiempo real; y/o
- (iii) transferencia Northern.
- 10 (iv) inmunoensayo.

En la invención, el método para determinar el resultado, es decir, el nivel de expresión del miARN, no necesita estar particularmente limitado, y puede seleccionarse mediante un método de perfilado de miARN, como una micromatriz, y/o un método que comprende PCR (reacción en cadena de la polimerasa), tal como tiempo de PCR; y/o Northern Blot.

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa en tiempo real (generalmente abreviada como RQ-PCR, RT-qPCR, rt-PCR o qPCR) es una técnica de cuantificación de la expresión de miARNs sensible y reproducible que se puede usar particularmente para perfilar la expresión de miARN en células y tejidos. Se puede utilizar cualquier método para evaluar los resultados de la RT-PCR, y se puede preferir el método ΔCt y el método $\Delta\Delta Ct$. El método $\Delta\Delta Ct$ se describe en detalle por Livak et al. (Methods 2001, 25: 402-408). (Ct = Valores umbral de ciclo). Al poner en práctica la presente invención, el método $\Delta\Delta Ct$ descrito por Livak et al. (Methods 2001, 25: 402-408) se utilizarán preferentemente. El $\Delta\Delta Ct$ -method incluirá una 'muestra de control' y una 'muestra de sujeto'. La 'muestra de sujeto' es una muestra del sujeto a analizar. Para cada muestra, se incluyen un miARN diana (aquí: miARN de interés) y un miARN de control endógeno (como se describe a continuación) para la amplificación por PCR a partir de alícuotas (típicamente en serie). Típicamente, se utilizan varias réplicas para cada concentración diluida para derivar la eficiencia de amplificación. La eficiencia de la amplificación por PCR se puede definir como porcentaje de amplificación (de 0 a 1). Durante la reacción de qPCR, un software mide típicamente para cada muestra el número de ciclo en el que la fluorescencia (indicador de amplificación por PCR) cruza una línea arbitraria, el umbral. Este punto de cruce es el valor Ct.

Una micromatriz es una matriz sobre un sustrato sólido (generalmente una lámina de vidrio o una célula de película delgada de silicio) que analiza grandes cantidades de material

biológico, en el presente caso una gran cantidad de diferentes miARNs o, preferiblemente, sus transcritos de ADN inversos, que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre el sustrato sólido.

- 5 Una transferencia Northern implica el uso de electroforesis para separar muestras de ARN por tamaño y detección posterior con una sonda de hibridación complementaria a (parte de) la secuencia diana del ARN de interés.

10 El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con un antígeno. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o chips de proteína.

15 En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo
20 complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich. El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad de anticuerpos frente a let-7c-5p, let-7d-5p, let-
25 7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoroforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse,
30 enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

35 El método de la presente invención se puede aplicar con muestras de individuos de cualquier sexo, es decir, hombres o mujeres, y a cualquier edad.

En el método de la presente invención, la expresión del miARN puede normalizarse, preferiblemente en relación con la expresión de otra molécula de ARN. Existen métodos de normalización bien conocidos en el estado de la técnica.

5 La invención proporciona un método para asignar a un sujeto humano en uno de los dos grupos: el grupo, que comprende sujetos identificables por el método de la invención y el grupo 2, que representa los sujetos restantes.

10 Es posible proporcionar una terapia personalizada a un individuo dependiendo de si el individuo está asignado al grupo 1 o al grupo 2. El grupo 1 comprende sujetos identificables por el método de la invención como individuos que padecen intolerancia a las estatinas y el grupo 2 representa los sujetos restantes.

15 Una "muestra de referencia", como se usa aquí, significa una muestra obtenida de un grupo de sujetos sanos que no tiene un estado de enfermedad o fenotipo particular.

20 Los niveles de referencia pueden ser determinada mediante la medición de los niveles de expresión, y esos niveles de referencia se puede ajustar a las poblaciones específicas (por ejemplo, un nivel de referencia puede estar relacionada con la edad, por lo que las comparaciones se puede hacer entre los niveles de expresión en las muestras de los sujetos de una cierta edad y niveles de referencia para una enfermedad particular, el fenotipo, o falta de ella en un determinado grupo de edad). En una realización preferida, la muestra de referencia se obtiene de varios sujetos en general, o de sujetos no intolerantes a las estatinas.

25 El experto en la técnica apreciará que el tipo de muestra de referencia puede variar dependiendo del método específico a realizar.

30 El perfil de expresión en la muestra de referencia de preferencia puede ser generado a partir de una población de dos o más personas. La población, por ejemplo, pueden contener 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más personas.

35 Una vez que los niveles de expresión en relación con los valores de referencia se han determinado, es necesario identificar si existen alteraciones en la expresión (aumento o disminución de la expresión). La expresión (y los niveles del producto de expresión del gen) se considera aumentada en una muestra de la materia objeto de estudio cuando los niveles

de incremento con respecto a la muestra de referencia son al menos de un 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos el 20%, al menos un 25%, por lo menos 30%, por lo menos el 35%, por lo menos el 40%, por lo menos 45%, por lo menos el 50%, por lo menos el 55%, por lo menos el 60%, por menos por lo menos 65%, por lo menos el 70%,
5 por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos 100%, por lo menos 1 10 %, por lo menos 120%, por lo menos 130%, por lo menos 140%, por lo menos 150%, o más. Del mismo modo, la expresión se considerada disminuida cuando sus niveles disminuyen con respecto a la muestra de referencia en al menos un 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos el 20%,
10 por lo menos el 25%, al menos un 30%, por lo menos el 35%, por lo menos el 40%, por lo menos 45%, por lo menos el 50%, por lo menos el 55%, por lo menos el 60%), por lo menos el 65%, por lo menos 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos 100% (es decir, ausente).

15 **Kit o composición de la invención y usos**

Otro **aspecto de la invención** se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para cuantificar el nivel de expresión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y/o miR-376c-3p, o cualquiera
20 de sus combinaciones.

Preferiblemente comprende los elementos necesarios para cuantificar simultáneamente let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p.

25 Aún más preferiblemente comprende los elementos necesarios para cuantificar simultáneamente let-7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p.

En una realización preferida el kit o dispositivo de la invención comprende:

- (a) medios para detectar en una muestra biológica obtenida del sujeto los niveles de expresión de los biomarcadores de la invención,
- 30 (b) medios para comparar el nivel de expresión de los biomarcadores determinados en (a) con una muestra de referencia,
- (c) instrucciones para que un profesional médico administre el tratamiento con estatinas únicamente a aquellos sujetos que se puedan clasificar en el grupo de no intolerantes a las estatinas.

35

En una realización preferida el kit o dispositivo que comprende al menos uno o más oligonucleótidos capaces de hibridar con miARNs let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y/o miR-376c-3p, o cualquiera de sus combinaciones.

5 Se prefiere que dicho oligonucleótido (s) sea capaz de hacerlo en condiciones de astringencia. En una realización preferida, uno o más de dichos uno o más oligonucleótidos (preferiblemente DNA) se definen adicionalmente mediante las siguientes sondas o primers: hsa-miRXX-miRCURY LNA miARN medidos con syber, cebadores específicos LNA TM PCR. La astringencia es un término usado en experimentos de hibridación. La astringencia refleja
10 el grado de complementariedad entre el oligonucleótido y el ácido nucleico (que en este caso es el miARN a detectar); cuanto mayor sea la astringencia, mayor porcentaje de homología entre la sonda y el ácido nucleico unido al filtro. El experto en la materia sabe bien que la temperatura y las concentraciones de sal tienen un efecto directo sobre los resultados que se obtienen. Se reconoce que los resultados de la hibridación están
15 relacionados con el número de grados por debajo de la T_m (temperatura de fusión) del ADN en el que se realiza el experimento. A menudo, las condiciones rigurosas se definen como un lavado con 0.1X SSC (solución salina-citrato de sodio (SSC) tampón a 65 °C. (SSC se proporciona generalmente como una solución madre 20X, que consiste en cloruro de sodio 3 M y citrato de trisodio 300 mM (ajustado a pH 7,0 con HCl)).

20 En realizaciones particulares, el kit se selecciona de (a) un kit adecuado para PCR, (b) un kit adecuado para Northern Blot, (c) un kit adecuado para análisis de micromatrices y (d) un inmunoensayo. También se pueden combinar dos o más de estas realizaciones, de modo que el kit pueda comprender, por ejemplo, tanto (a) como (c).

25 En el caso de (a) un kit adecuado para la PCR, esta PCR es típicamente una PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR), una técnica de cuantificación de la expresión génica sensible y reproducible. En este caso, se desea que el kit comprenda adicionalmente un cebador de oligonucleótido poliT además del oligonucleótido (s) del kit. El cebador
30 oligonucleotídico poliT se puede usar junto con el oligonucleótido (s) de la invención para la PCR de cebado, después de la poliadenilación de los miARNs aislados mediante métodos conocidos por los expertos, como el uso de poli-(A) polimerasa y ATP. Estos reactivos pueden estar incluidos opcionalmente en el kit.

Una transferencia Northern implica el uso de electroforesis para separar muestras de ARN por tamaño y detección posterior con un oligonucleótido (s) (sonda de hibridación) complementaria a (parte de) la secuencia diana del ARN de interés.

5 También es posible que el oligonucleótido (s) esté inmovilizado en manchas en una superficie (preferiblemente sólida). En una realización del mismo, el kit comprende una micromatriz. Una micromatriz de ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (generalmente un portaobjetos de vidrio o una célula de película delgada de silicio) que analiza grandes cantidades de diferentes ARNs (en este caso miARN), que se pueden detectar mediante
10 sondas específicas inmovilizadas en puntos del sustrato sólido. Cada punto contiene una secuencia específica de ácido nucleico, típicamente una secuencia de ADN, conocida como sondas (o informadores). Si bien el número de manchas no está limitado, existe una realización preferida en la que la micromatriz se adapta a los métodos de la invención. En una realización, una micromatriz personalizada de este tipo comprende cincuenta puntos o
15 menos, tales como treinta puntos o menos, incluyendo veinte puntos o menos.

El kit o dispositivo de la invención puede usarse y el uso no está particularmente limitado, aunque se prefiere el uso en el método de la invención en cualquiera de sus realizaciones.

20 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los oligonucleótidos, cebadores, sondas o anticuerpos están modificados o marcados, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante un marcaje radiactivo o inmunológico. Así, preferiblemente, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo
25 radiactivo, normalmente ^{32}P o tritio, nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

El kit o dispositivo de la invención puede comprender controles, instrucciones de programa e
30 información necesaria para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

Otro **aspecto de la invención** se refiere al uso de cualquiera de los kits o dispositivos de la presente invención, en la obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la intolerancia al tratamiento con estatinas en un individuo, preferiblemente donde el individuo presenta un
35 con alto riesgo cardiovascular.

Automatización del método de la invención implementándolo en un programa de ordenador

Otro **aspecto de la invención** se refiere a un programa de ordenador que comprende
5 instrucciones para realizar el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

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

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

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

Otros aspectos de la invención se refieren al medio de almacenamiento legible y a la señal
transmisible que comprende instrucciones de programa necesarias para la ejecución del
35 método de invención por un ordenador.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Perfiles de microARN en plasma de pacientes tolerantes a las estatinas (ST) (n = 10) e intolerantes a las estatinas (SI) (n = 10). Mapa de calor de 6 colores basado en valores de expresión de miARN sin procesar (el rojo y el amarillo representan una expresión baja y el azul y el púrpura representan una expresión alta). Los niveles de expresión de miARN se normalizaron a miR-148a-3p y hsa-let-7b-5p.

20 **Fig. 2.** Diagramas de caja de los niveles de expresión de miARN normalizados a miR-148a-3p en sujetos tolerantes a las estatinas ST (n = 45) e intolerantes a las estatinas SI (n = 39). El análisis se llevó a cabo mediante qPCR. Los datos se presentan en log₂. Los datos representan la media ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005. Cada documento representa a un paciente. Las barras de error representan la desviación estándar (SD).

25 **Fig. 3.** Curvas ROC para evaluar el rendimiento predictivo de miARNs expresados diferencialmente. (A) Curvas ROC para let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p. (B) La curva ROC del panel de 5 miARNs, es decir, el valor de combinación de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p.

30 **Fig. 4.** Curvas ROC para evaluar el rendimiento predictivo de parámetros clínicos en combinación con miARN expresados diferencialmente. (A) Diagrama de caja de años de dislipidemia (DLP) en sujetos tolerantes a las estatinas (ST) (n = 45) e intolerantes a las estatinas (SI) (n = 39). (B) Diagrama de caja de niveles no HDL-c en sujetos tolerantes a las estatinas ST (n = 45) e intolerantes a las estatinas (SI) (n = 39). (C) Curvas ROC para cada parámetro clínico, DLP y no HDL-c, y para la combinación de DLP más no HDL-c. (D) La
35

curva ROC del valor de combinación del panel 3-miARN (let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p), DLP y no HDL-c.

Fig. 5. Análisis KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y GO (gene ontology) de miARN expresados diferencialmente. (A) red de genes de miARN para let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p. (B) Diagrama de Venn que muestra la superposición de objetivos genéticos de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p. (C) Análisis de enriquecimiento funcional GO y KEGG de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p.

10

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Estudio de población y diseño

15 Se trata de un estudio prospectivo multicéntrico. Los pacientes fueron reclutados consecutivamente de tres centros de campo (Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz; Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla; y Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, España).

20 Los criterios de inclusión fueron: pacientes mayores de 18 años con riesgo cardiovascular alto y muy alto en tratamiento con estatinas que hayan sido derivados a la Unidad de Lípidos de estos centros.

Se incluyeron un total de 82 sujetos consecutivos divididos en dos grupos diferentes: i) 25 pacientes intolerantes a las estatinas (SI) (n=37) y, ii) pacientes tolerantes a las estatinas (ST) (n=45). La intolerancia a las estatinas (SI) se definió según los criterios de la Agencia Europea del Medicamento (*Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment of lipid disorders*;

30 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/01/WC500159540.pdf). Todos los pacientes fueron clasificados según el grado de riesgo cardiovascular de la guía ESC/EAS de 2019 para el manejo de dislipidemias (<https://www.escardio.org/Guidelines/Clinical-Practice-Guidelines/Dyslipidaemias-Management-of>).

Se consideró de muy alto riesgo cardiovascular a los pacientes con enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD) clínicamente documentada o inequívoca en imagen, pacientes con diabetes mellitus (DM) con daño de órgano blanco o al menos tres factores de riesgo mayores, o mellitus diabetes tipo 1 de inicio temprano con una duración más de 20 años, enfermedad renal crónica (ERC) grave (tasa de filtración glomerular estimada [TFGe < 30 ml7min/1,73 m2] o un SCORE calculado igual/superior al 10 % para 10 años de riesgo de ECV mortal e hipercolesterolemia familiar (HF) con un ASCVD o con otro factor de riesgo mayor Se definió como alto riesgo cardiovascular a los pacientes con un único factor de riesgo marcadamente elevado, en particular colesterol total por encima de 310 mg/dl, LDLc por encima de 190 mg/dl, o presión arterial (PA) igual/por encima de 180/110 mg/dl, HF sin otro factor de riesgo mayor, pacientes con DM sin daño de órgano diana, DM de más de 10 años de evolución u otro factor de riesgo adicional, ERC moderada (FGe: 30-59mL7min/1,73 m2) o SCORE calculado $\geq 5\%$ y $< 10\%$ f o 10 años-riesgo de ECV fatal.

Los criterios de exclusión fueron pacientes mayores de 80 años o fragilidad marcada, actividad física intensa, consumo elevado de alcohol, pacientes que presentaran enfermedad inflamatoria crónica, autoinmune o tumoral u otra terapia farmacológica que interfiriera en las vías metabólicas de las diferentes estatinas. También se excluyeron del estudio los sujetos con síntomas musculares previos, enfermedad miopática, niveles elevados de creatina quinasa o hipotiroidismo.

Se obtuvo información antropométrica, clínica y farmacológica detallada de cada sujeto, incluidos los factores de riesgo cardiovascular y los eventos vasculares previos. A todos los pacientes se les realizó un análisis de sangre que incluía perfil tiroideo, hepático, renal y lipídico, así como creatina quinasa. El comité de ética de nuestra institución (Comité de Ética de la Investigación de Cádiz) aprobó el protocolo de estudio. El estudio se realizó en pleno cumplimiento de la Declaración de Helsinki II. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

30 **Recogida de sangre**

Se recogieron diez mililitros de sangre periférica en tubos de ácido K2-etilendiaminotetraacético (BD) después de 10h de ayuno nocturno y se centrifugaron inmediatamente (1500 xg, 15 min, 4°C). La sangre se procesó dentro de las 4h posteriores al aislamiento. La capa superior que contenía plasma se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

Aislamiento de ARN

Se utilizó el kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen) para extraer el ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó un total de 200 µL de alícuotas de plasma para obtener un volumen final suficiente. Como controles internos de amplificación, se agregaron miARN sintético de *C. Elegans* (cel-miR-39-3p) ($1,6 \times 10^8$ copias/µl) (Qiagen) y UniSp6 (Qiagen) antes de la extracción.

10 miARN reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real

Para evaluar los niveles de expresión de miARN y los perfiles de los grupos SI y ST, se realizó un análisis de 179 microARN de especies de miARN que se sabe que están presentes en el suero humano utilizando el kit miRCURY LNA RT (Qiagen) para transcripción inversa, el kit miRCURY LNA SYBR Green PCR (Qiagen) para la amplificación por PCR cuantitativa (qPCR) y paneles de PCR de microARN humano Focus en suero/plasma (Exiqon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de umbral de ciclo sin procesar (Cq) se calibraron entre placas usando UniSp3. Los Cq por encima de 35 ciclos se censuraron al nivel mínimo observado para cada miARN. Como miARN de limpieza para la normalización de datos, seleccionamos el par de miARN expresado de forma más estable (miR-148a-3p y let-7b-5p) según lo determinado por el algoritmo Normfinder (Andersen et al., 2004). En consecuencia, cada miARN individual se normalizó como $\Delta Cq = \text{mean}(Cq_{\text{miR-148a-3p}}, \text{let-7b-5p}) - Cq_{\text{miRNA}}$.

25 Los niveles de miARN se transformaron logarítmicamente antes de usarse en los análisis estadísticos.

El ARN se transcribió inversamente utilizando el kit miRCURY LNA RT (Qiagen). La qRT-PCR se realizó con el kit miRCURY LNA SYBR Green PCR (Qiagen), como se describió anteriormente (Belmonte et al., 2020) y las curvas de amplificación se evaluaron con el software CFX Manager™ (BioRad). La especificidad de la amplificación se corroboró mediante el análisis de la curva de fusión.

35

Análisis de red de genes de miARN

Los miARN obtenidos se analizaron utilizando la base de datos miRNet (<https://www.mirnet.ca>) para predecir los genes objetivo. Se realizó un análisis de la base de datos para identificar la función biológica utilizando el análisis de enriquecimiento Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org/>) (Huaiyu M et al, 2019) y la Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>). La herramienta de búsqueda para la recuperación de la base de datos de genes interactivos (STRING) (<http://www.string-db.org/>) se utilizó para analizar las redes de interacción proteína-proteína (PPI) (Szkłarczyk, D. et al., 2019).

10 **Análisis de enriquecimiento de términos KEGG y GO**

El software en línea miRNet (<https://www.mirnet.ca>) se utilizó para predecir los genes objetivo y construir la red reguladora de miARN-ARNm. La herramienta computacional WebGesalt (GEne SeT AnaLysis Toolkit basada en Web) para la vía KEGG y el análisis de términos GO. Se empleó el análisis del término GO para determinar la participación de los 5 miARN expresados diferencialmente en el proceso biológico y la enfermedad.

Análisis estadístico

20 Las variables continuas se muestran como media \pm desviación estándar (SD). Las variables categóricas se expresan en frecuencia y porcentaje de pacientes (%).

Las comparaciones entre grupos de los niveles de miARN se realizaron mediante pruebas de rango no paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para variables continuas. Se realizó un análisis de diferencias entre grupos mediante análisis de varianza.

Se trazaron curvas ROC que caracterizan el rendimiento diagnóstico de los miARN candidatos y modelos de regresión logística para determinar el área bajo la curva (AUC) y la especificidad y sensibilidad de los puntos de corte óptimos. Las curvas ROC se generaron trazando la sensibilidad frente a la especificidad 1. Los datos se presentaron como AUC e intervalos de confianza del 95%. Los cambios en los valores de p de sus variables se evaluaron mediante la prueba de Wald y una razón de verosimilitud. Se utilizó el paquete de software estadístico R (www.r-project.org) para todos los análisis (Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.r-project.org>).

35

RESULTADOS

Parámetros clínicos entre pacientes SI y ST

Las características antropométricas y clínicas de las cohortes intolerantes a las estatinas (SI) y tolerantes a las estatinas (ST) se muestran en la Tabla 1. En este estudio se reclutó un total de 84 pacientes, 39 pacientes SI y 45 pacientes ST en el grupo de control. Los sujetos no mostraron diferencias significativas en cuanto a la edad. Entre los grupos, la población masculina fue mayor que la femenina, sin embargo, los casos de SI femenina (61,5%) fueron significativamente más frecuentes (38,5%) ($p = 0,01$); en cambio, se observó un menor porcentaje de mujeres (31%) en el grupo ST. En cuanto a los datos cardiovasculares previos, la presencia de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD), los años de dislipidemia (DLP) ($p = 0,003$) y la hipertensión arterial ($p = 0,006$) fueron significativamente diferentes entre los grupos. Por otro lado, la concentración plasmática de no HDL-c ($p < 0,001$) mostró diferencias significativas entre los grupos SI y ST. Finalmente, en cuanto a la evaluación de la ingesta de medicamentos, el uso de receptores agonistas de angiotensina (ARB) ($p = 0,004$), diuréticos ($p = 0,003$), bloqueadores beta ($p = <0,001$), bloqueadores alfa ($p = 0,03$) y aspirina ($p = <0,001$) hubo diferencias significativas entre las cohortes SI y ST.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de base de los pacientes con ST y SI.

Datos presentados como media \pm SD para variables continuas y como porcentaje para variables categóricas. La diferencia entre los pacientes con ST y SI se evaluó con la prueba t de Student no pareada, Pearson Chi-Square y Wilcoxon testc.

NS, no significativo; ASCVD, enfermedad cardiovascular aterosclerótica; ARA II, antagonista del receptor de angiotensina II; MDRD-4, tasas de filtración glomerular; CPK, creatina fosfoquinasa; ACE, enzima convertidora de angiotensina; ARB, bloqueadores de los receptores de angiotensina II; ADO, fármacos antidiabéticos orales; BCC, bloqueadores de los canales de calcio; ASA, aspirina.

Variables	ST	SI	p valor
<i>n</i>	45	39	
Antropométrico			
Edad (años) ^a	66.6 ± 11.5	63.6 ± 10.9	NS
Sexo (varón, %) ^b	31	61.5	0.01
Dislipidemia (años) ^c	5.6 ± 6.3	9.1 ± 7.5	0.003
Tensión arterial alta (%) ^b	73	41	0.006
Riesgo cardiovascular			
Diabetes Mellitus (%) ^b	38	20.5	NS
ASCVD (%) ^b	71	13	<0.001
Enfermedad renal crónica (%) ^b	18	12,8	NS
Perfil analítico			
Glucosa basal en sangre ^a	118.5 ± 36.2	110 ± 44.6	NS
No-HDLc (mg/dL) ^a	104.9 ± 32.7	169.9± 63.5	<0.001
Triglicéridos (mg/dL) ^a	151.7 ± 97.4	164 ± 93	NS
MDRD-4 (mL/min) ^a	76.5 ± 25.6	82 ± 31.6	NS
Transaminasa GOT (U/L) ^a	23.1 ± 13	23.5 ± 8	NS
Transaminasa GPT (U/L) ^a	27.3 ± 23	24.6 ± 18.9	NS
CPK (U/L) ^a	82.8 ± 40.4	165.9 ± 14.7	NS
Tratamiento (%)^b			
Ezetimiba	42	38	NS
Fibratos	18	7.7	NS
Inhibidores ACE	11	2.5	NS
ARBs	67	33.3	0.004
ADOs	33	18	NS
Uso de insulina	11	10.5	NS
Diurético	51	18	0.003
BCCs	31	18	NS
Beta-bloqueadores	62	15.4	<0.001
Alfa-bloqueadores	22	5	0.03
ASA	64	18	<0.001
Uso de Acenocumarol	7	7.6	NS

Perfil de microARN en plasma en pacientes con SI

Para evaluar si los miARN plasmáticos se expresaron de manera diferencial entre los grupos, primero analizamos el perfil de 179 miARN circulantes que se encuentran comúnmente en el plasma humano en pacientes de la misma edad con 10 SI y 10 ST (Figura 1). Los criterios establecidos para la selección de candidatos a miARN fueron altos niveles de expresión (mediana de Cq < 32 y detectados en al menos el 80% de todas las muestras) y significación estadística ($p < 0,05$). Un total de 10 miARN, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-128-3p, miR-186-5p, miR-30e-3p, miR-376a-3p, miR-376c-3p, miR-543 y miR-574-3p, se expresaron significativamente de acuerdo con los criterios de selección y se seleccionaron para un análisis posterior.

Estudio de validación de miARNs y su correlación con parámetros clínicos

Para confirmar la solidez diagnóstica de nuestra firma de miARN descubierta para discriminar entre cohortes ST y SI, luego realizamos la validación de estos 10 miARN en una población total, 45 SI y 39 sujetos ST. Nuestros resultados mostraron que let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p aumentaron significativamente en plasma de la cohorte SI frente a ST (Figura 2). Investigamos la asociación entre los miARN expresados diferencialmente y algunos parámetros clínicos en el grupo SI. Se seleccionaron años de dislipidemia (DLP) y niveles no HDL-c ya que muestran diferencias significativas entre los pacientes SI y ST, y estas diferencias podrían estar relacionadas con la condición SI. No se encontró correlación entre los parámetros clínicos seleccionados con los miARN expresados diferencialmente (Tabla 2).

Tabla 2. Correlación entre el parámetro clínico (DLP y no HDL-c) y los microARN individuales en sujetos SI.

SI: intolerantes a las estatinas; DLP: años de dislipidemia. Coeficiente significativo a $p < 0,05$.

microARN	SI			
	DLP (años)		No-HDL-c (mg/dL)	
	Pearson r	<i>p</i>	Pearson r	<i>p</i>
Let-7c-5p	-0.164	0.281	0.177	0.244
Let-7d-5p	-0.079	0.603	0.226	0.131
Let-7f-5p	-0.136	0.368	0.168	0.266
miR-376a-3p	-0.173	0.250	0.103	0.498
miR-376c-3p	-0.265	0.079	0.176	0.248

miARN circulante como marcador y predictor temprano de SI

5 Evaluamos la capacidad de los miARN circulantes expresados diferencialmente para discriminar entre pacientes SI y ST utilizando el AUC-ROC. Para ello, generamos una curva ROC para evaluar la precisión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p como biomarcadores plasmáticos para la detección de SI. En la Figura 3A, se muestra que miR-376c-3p logró el AUC más alto con un valor de 0,736 (IC del 95 %: 0,627–0,845; $p < 0,001$), lo que indica un desempeño moderado para discriminar entre pacientes SI y ST. Let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p y miR-376a-3p muestran valores de AUC de 0,652, 0,627, 0,688 y 0,682, respectivamente.

15 Posteriormente, consideramos el potencial diagnóstico del conjunto de 5-miARN para discriminar entre individuos SI y ST. El AUC para el valor de combinación de los miARN seleccionados (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p) fue de 0,936 (IC 95 %: 0,887– 0,985; $p < 0,001$) (Figura 3B), demostrando un mejor rendimiento diagnóstico. La sensibilidad, la especificidad y la precisión de cada miARN y el panel de 5 miARN se muestran en la Tabla 3.

20

Tabla 3. Evaluación del potencial de los miARN expresados diferencialmente y el panel de 5 miARN (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p) para biomarcadores.

SI, intolerantes a estatinas; AUC, área bajo la curva; IC, intervalo de confianza.

25

miARN	AUC (95% IC)	Sensibilidad %	Especificidad %	Exactitud %	p valor
Let-7c-5p	0.652 (0.535 a 0.770)	61.70	55.56	59.04	0.017
Let-7d-5p	0.627 (0.507 a 0.747)	52.63	58.70	55.95	0.046
Let-7f-5p	0.688 (0.573 a 0.803)	60,53	64.44	62.65	0.003
miR-376a-3p	0.682 (0.563 a 0.800)	68,89	64.10	66.67	0.004
miR-376c-3p	0.736 (0.627 a 0.845)	70.45	64.10	67.47	<0.001
5-miARN panel	0.936 (0.887 a 0.985)	81.25	84.85	82.72	<0.001

Combinación de miARN expresado diferencialmente, años de dislipidemia (DLP) y concentración de colesterol no HDL-c para diagnosticar pacientes con SI

- 5 Los años de dislipidemia y la concentración plasmática de colesterol no HDL fueron significativamente más altos en pacientes SI en comparación con ST (Figura 4A y B). Primero evaluamos el potencial de estos dos parámetros clínicos para distinguir entre los grupos SI y ST. Las curvas ROC de años de dislipidemia y concentración de colesterol no HDL mostraron valores de AUC de 0,700 y 0,807, lo que indica un rendimiento moderado para discriminar pacientes con SI de ST, mientras que la combinación de estos dos parámetros alcanzó un valor de AUC de 0,844 (tabla 4). Investigamos más a fondo si el rendimiento diagnóstico para evaluar a los pacientes con SI podría aumentar utilizando un modelo multivariante que combina miARN expresados diferencialmente, años de dislipidemia y/o colesterol no HDL. El rendimiento diagnóstico del panel de 5 miARN solo mejoró ligeramente con la variable años de dislipidemia ya que, aunque el valor de AUC fue similar, este modelo logró una precisión del 84,81 % frente al 82,72 % mostrado por el panel de 5 miARN (Figura 4D y E). Por el contrario, la capacidad de diagnóstico del panel de 5 miARN junto con la concentración de colesterol no HDL fue menor que la del panel de 5 miARN solo, ya que la curva ROC mostró un valor de AUC de 0,855 (Figura 4D y Tabla 4).
- 10
- 15
- 20 Curiosamente, el mayor rendimiento diagnóstico se alcanzó con la combinación del panel de 3 miARN compuesto por let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p, y años de dislipidemia (DLP) más la concentración de colesterol no HDL con un valor de AUC de 0,954 y una precisión del 89,47% (Figura 4D y Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación del potencial de los parámetros clínicos (DLP y no HDL-c) y los modelos multivariantes como biomarcadores.

Parametro clinico/modelo	AUC (95% IC)	Sensibilidad %	Especificidad %	Exactitud %	p valor
DLP (años)	0.700 (0.587 a 0.814)	57.89	60.00	58.54	0.017
No-HDL-c (mg/dL)	0.807 (0.703 a 0.911)	77.08	84.38	80.00	<0.001
DLP + no-HDL-c	0.844 (0.751 a 0.937)	79.55	85.29	82.05	<0.001
5-miARN panel + DLP	0.940 (0.892 a 0.989)	85.71	83.78	84.81	<0.001
5-miARN panel + non-HDL-c	0.889 (0,814 a 0,964)	85.00	81.08	83.12	<0.001
3-miARN panel + DLP + no-HDL-c	0.954 (0.911 a 0.998)	89.74	89.19	89.47	<0.001

5 SI: intolerante a estatinas; AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza; DLP: años de dislipidemia; No-HDL-c: colesterol no HDL;

Análisis de enriquecimiento de ontología de genes y rutas KEGG

10 A continuación, investigamos la importancia biológica de los 5 miARN expresados diferencialmente mediante el enriquecimiento de Gene Ontology (GO) y el análisis de la ruta de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG). Utilizamos el software en línea miRNet (<https://www.mirnet.ca>) para predecir los objetivos putativos de 7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p (Figura 5A). Los 7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p se asociaron con 516, 394, 397, 112 y 84 mARN en la base de datos miRNet, respectivamente (Figura 5B). Estos 5 miARN solo compartían un objetivo de ARNm, IGF1R (Figura A y B). El análisis GO utilizando la herramienta computacional WebGesalt (WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit) mostró un enriquecimiento significativo de los procesos biológicos relacionados con la respuesta al factor de crecimiento nervioso, el ciclo celular, el silenciamiento génico y la respuesta al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otros (Figura 5C, panel izquierdo). El análisis de la vía KEGG mostró varias vías, las más significativas de las cuales son la vía de señalización de p53, la resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa de EGFR y el glioma (Figura 5C, panel derecho). Finalmente, el análisis de enriquecimiento de enfermedades identificó que estos 5 miARN podrían estar involucrados en la leucemia, la miopatía mitocondrial y la diabetes mellitus (no insulino dependiente), entre otros (Figura 5C, panel inferior).

Referencias

- 5 Mach et al., 2020, "2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk", *Eur Heart J*, 2020 Jan 1; 41(1):111-188. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455.
- 10 Townsend, N. et al., 2016, "Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016", *European Heart Journal*, Volume 37, Issue 42, 7 November 2016, Pages 3232–3245, doi.org/10.1093/eurheartj/ehw334.
- 15 Yusuf, S., et al., 2004, "Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study" *Lancet*, 2004. 364(9438): p. 937-952. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17018-9.
- 20 Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, et al., 2020, "Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials", *Lancet* 376(9753):1670-81, doi: 10.1016/S0140-6736(10)61350-5.
- 25 Banach M. et al., 2016, "Statin non-adherence and residual cardiovascular risk: There is need for substantial improvement", *I. J. Cardiol.* 225:184-196. doi:10.1016/j.ijcard.2016.09.075.
- 30 Stulc T, Ceska R, Gotto Jr A., 2015, "Statin intolerance: The clinician's perspective", *Curr Atheroscler Rep*, 2015; 17: 69. doi: 10.1007/s11883-015-0552-3.
- Guyton JR, Bays HE, Grundy SM, Jacobson TA, The National Lipid Association Statin Intolerance Panel, 2014, "An assessment by the Statin Intolerance Panel: 2014 update", *J Clin Lipidol*, 2014; 8: S72-S8121 doi: 10.1016/j.jacl.2014.03.002.
- 35 Wai MY, Ito MK, Cohen JD, Brinton EA, Jacobson TA, 2013, "Predictors of statin adherence, switching, and discontinuation in the USAGE survey: understanding the use of statins in America and gaps in patient education", *J Clin Lipidol*, 2013; 7: 472-484. doi: 10.1016/j.jacl.2013.03.001.

- Rosenson, R. S., Baker, S. K., Jacobson, T. A., Kopecky, S. L. & Parker, B. A., 2014, "An assessment by the statin muscle safety task force: 2014 update", *J. Clin. Lipidol.* 8, S58–S71. 20.
- 5 Zhang H, et al., 2017, "Continued statin prescriptions after adverse reactions and patient outcomes: a cohort study", *Ann Intern Med.* 2017; 167:221–227. doi: 10.7326/M16-0838.
- Takeshi Hirota, Yuito Fujita & Ichiro Ieiri. 2020. "An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins" *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 16:9, 809-822, doi: 10.1080/17425255.2020.1801634.
- 10 Ubilla Carmen Gloria, Prado Yalena, Angulo Jeremy, Obreque Ignacio, Paez Isis, Saavedra Nicolás, Saavedra Kathleen, Zambrano Tomás, Salazar Luis A. 2021."MicroRNA-33b is a Potential Non-Invasive Biomarker for Response to Atorvastatin Treatment in Chilean Subjects With Hypercholesterolemia: A Pilot Study". *Frontiers in Pharmacology* 12, 2021. doi:10.3389/fphar.2021.674252
- Arrigoni, Elena, Marzia Del Re, Leonardo Fidilio, Stefano Fogli, Romano Danesi, and Antonello Di Paolo. 2017. "Pharmacogenetic Foundations of Therapeutic Efficacy and Adverse Events of Statins" *International Journal of Molecular Sciences* 18, no. 1: 104. <https://doi.org/10.3390/ijms18010104>.
- 20 Shun Saito, Takeo Nakanishi, Yuma Shirasaki, Miki Nakajima, Ikumi Tamai. 2017 "Association of miR-145 With Statin-Induced Skeletal Muscle Toxicity in Human Rhabdomyosarcoma RD Cells" *Research Article Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Transport and Metabolism*, volume 106, issue 9, p2873-2880, september 01, 2017 <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.005>
- Tomás Zambrano, Rosario D.C. Hirata, Mario H. Hirata, Álvaro Cerda, Luis A. Salazar. 2018 "Statins differentially modulate microRNAs expression in peripheral cells of hyperlipidemic subjects: A pilot study". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 117, 2018, Pages 55-61, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.02.007>.
- 30 David P, B., 2004, "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function", *Cell*. Volume 116, Issue 2, 23 January 2004, Pages 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5).
- 35

He et al., 2004, "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation" *Nat. Rev. Genet.* 2004 Jul; 5 (7): 522-31. doi: 10.1038/nrg1379.

- 5 Stepień E., 2018, "The circulating non-coding RNA landscape for biomarker research: lessons and prospects from cardiovascular diseases", *Acta Farmacologica Sinica*, 39, pages1085–1099. doi.org/10.1038/aps.2018.35.

10 Lu D. et al., 2019, "RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease", *Nat. Rev. Cardiol.* 16:661–674.

Belmonte et al., 2020, "Emerging role of microRNAs in dilated cardiomyopathy: evidence regarding etiology", *Transl Res.* 2020 Jan; 215:86-101. doi: 10.1016/j.trsl.2019.08.007. Epub 2019 Aug 23. PMID: 31505160.

15

Huaiyu M et al., 2019, "PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools", *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue D1, Pages D419–D426. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1038>.

20 Szklarczyk, D. et al., 2019, "STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets", *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue D1, Pages D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.

25 Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Orntoft, T.F. 2004 "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets". *Cancer Res.* 2004, 64, 5245–5250.

30

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* de los niveles de expresión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y/o miR-376c-3p como biomarcadores para diagnosticar la intolerancia a las estatinas en
5 pacientes con riesgo cardiovascular, donde la sobreexpresión de dichos biomarcadores con respecto a los valores medios de referencia de individuos sanos permite asignar a un individuo al grupo de pacientes que va a sufrir efectos adversos derivados del tratamiento con estatinas.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde los biomarcadores let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p se utilizan simultáneamente.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde los biomarcadores let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p se utilizan simultáneamente.
- 15 4. El uso según la reivindicación 1 que además comprende el uso como biomarcadores de variables clínicas a seleccionar entre, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, hipertensión arterial, años de dislipidemia y/o el nivel de colesterol no-HDL, donde la presencia de enfermedad cardiovascular aterosclerótica, la presencia de
20 hipertensión arterial, valores superiores a los de un individuo normal en años de dislipidemia y/o valores superiores a los de un individuo normal en el nivel de colesterol no-HDL son indicadores de intolerancia a las estatinas.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, que además comprende el uso como
25 biomarcadores de los años de dislipidemia y/o el nivel de colesterol no-HDL, donde valores superiores a los valores medios de referencia de individuos sanos en estas variables clínicas es indicador de intolerancia a las estatinas.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, que además comprende el uso como
30 biomarcadores de los años de dislipidemia y el nivel de colesterol no-HDL, donde valores superiores a los valores medios de referencia de individuos sanos es indicador de intolerancia a las estatinas.
7. Método *in vitro* de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la intolerancia a
35 estatinas en individuos con riesgo cardiovascular que comprende:
 - a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,

- b) cuantificar los niveles de expresión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p, o cualquiera de sus combinaciones.
- 5 8. El método *in vitro* de obtención de datos útiles según la reivindicación 7 que además comprende:
- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.
9. El método *in vitro* de obtención de datos útiles según la reivindicación 7 que en su paso b) cuantifica la cantidad de producto de expresión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p simultáneamente.
- 10 10. El método *in vitro* de obtención de datos útiles según la reivindicación 7 que en su paso b) cuantifica la cantidad de producto de expresión de let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p simultáneamente.
- 15 11. El método *in vitro* de obtención de datos útiles según las reivindicaciones 7 -10 donde los pasos (b) y/o (c) pueden ser total o parcialmente automatizados.
12. El método *in vitro* para predecir o pronosticar la intolerancia a estatinas en individuos con riesgo cardiovascular que incluye los pasos (a) - (c) de la reivindicación 8 y que además comprende:
- 20 d) asignar al individuo que presenta en un análisis, antes de administrarle el tratamiento con estatinas, los niveles de expresión de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y/o miR-376c-3p sobreexpresados con respecto a los valores medios de un individuo normal, al grupo de pacientes que va a sufrir efectos adversos derivados del tratamiento con estatinas.
- 25 13. El método según la reivindicación 12 donde los niveles de expresión de los biomarcadores let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a- 3p y miR-376c-3p se encuentran sobreexpresados simultáneamente.
- 30 14. El método según la reivindicación 12 donde los niveles de let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3 se encuentran sobreexpresados simultáneamente.
- 35 15. El método según las reivindicaciones 7 a 14, donde la muestra biológica se selecciona entre sangre, plasma y suero.

16. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, donde la muestra biológica es plasma.
- 5 17. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, en el que dicho resultado se obtiene mediante:
- (i) un método de generación de perfiles de miARNs, como un microarray, y/o
 - 10 (ii) un método que comprende PCR (reacción en cadena de la polimerasa), tal como PCR en tiempo real;
 - (iii) transferencia Northern y/o
 - (iv) inmunoensayo.
18. Un kit que consiste en oligonucleótidos capaces de hibridar con let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p y los elementos necesarios para cuantificar en una muestra biológica obtenida del sujeto los niveles de expresión de dichos biomarcadores.
- 15 19. Un kit que consiste en oligonucleótidos capaces de hibridar simultáneamente let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p y los elementos necesarios para cuantificar en una muestra biológica obtenida del sujeto los niveles de expresión de dichos biomarcadores.
- 20 20. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 18 - 19 que además comprende medios para comparar el nivel de expresión de los biomarcadores con una muestra de referencia.
- 25 21. El kit según la reivindicación 20 que además comprende instrucciones para que un profesional médico administre el tratamiento con estatinas únicamente a aquellos sujetos que se puedan clasificar en el grupo de no intolerantes a las estatinas.
- 30 22. Uso *in vitro* del kit según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, para predecir o pronosticar la intolerancia al tratamiento con estatinas en un individuo con riesgo cardiovascular.

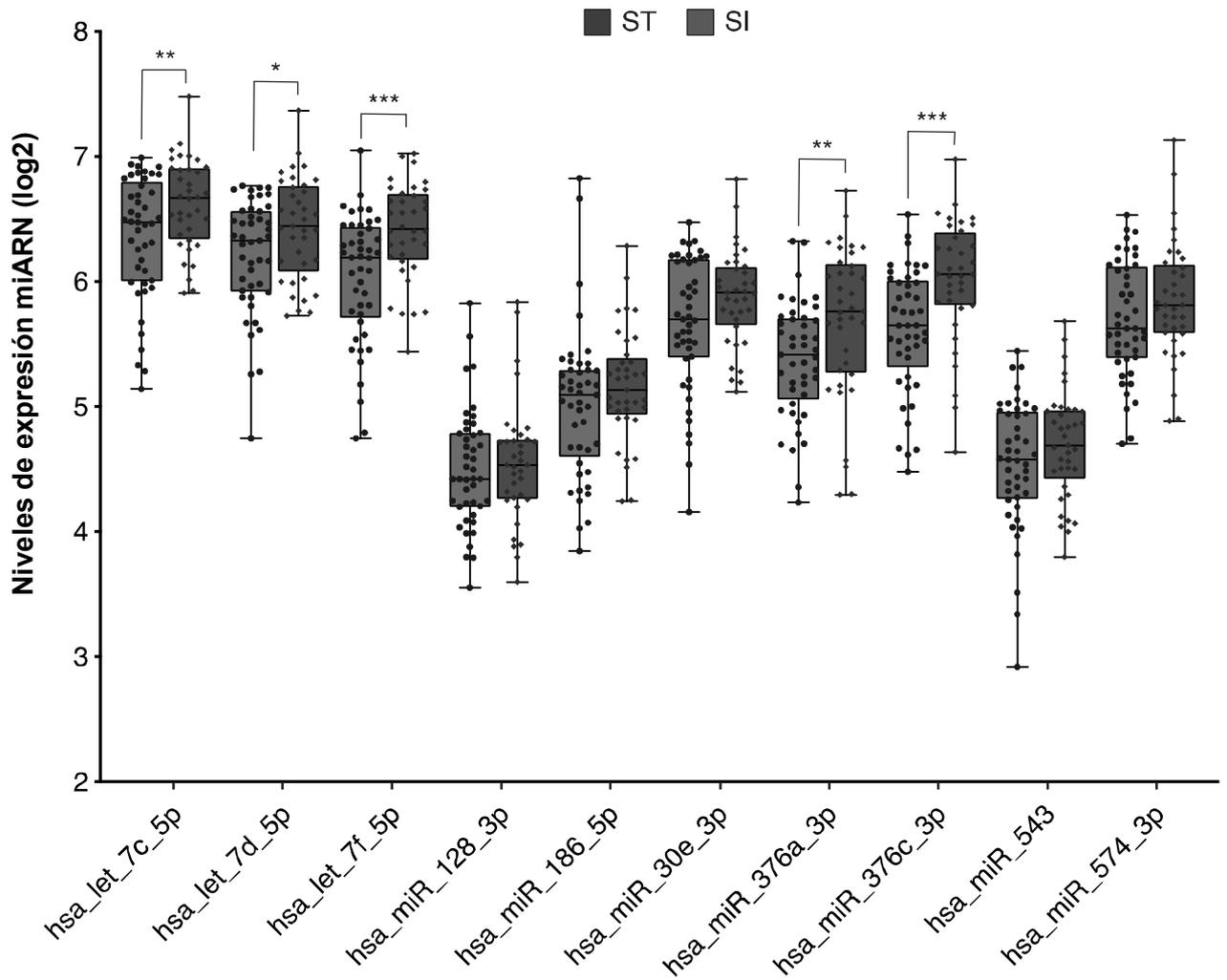


Fig. 2

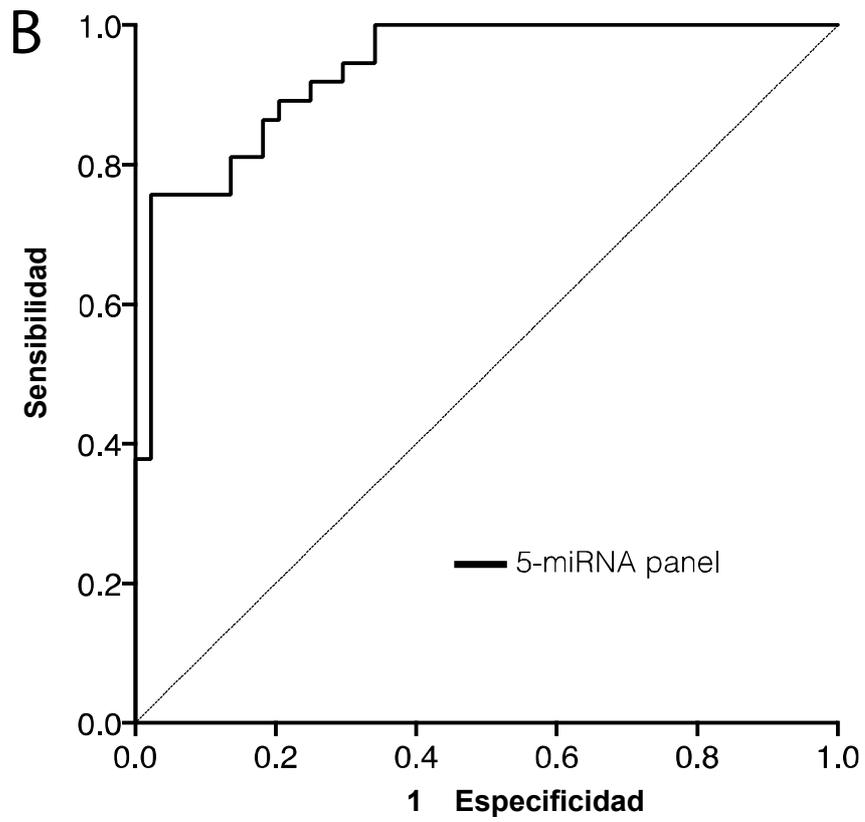
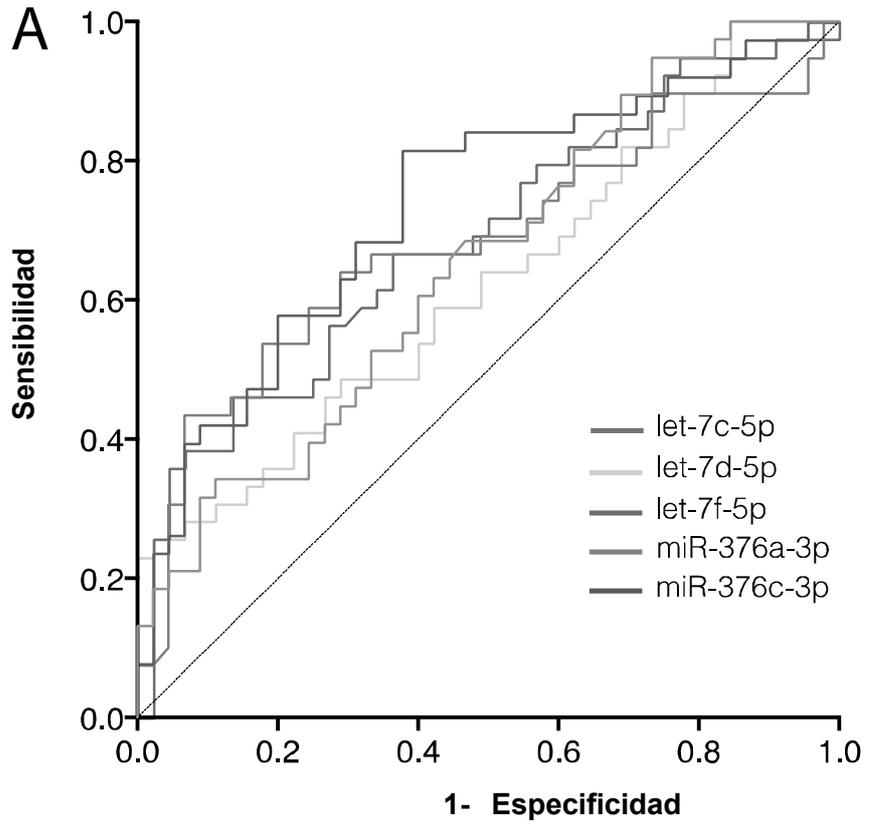


Fig. 3

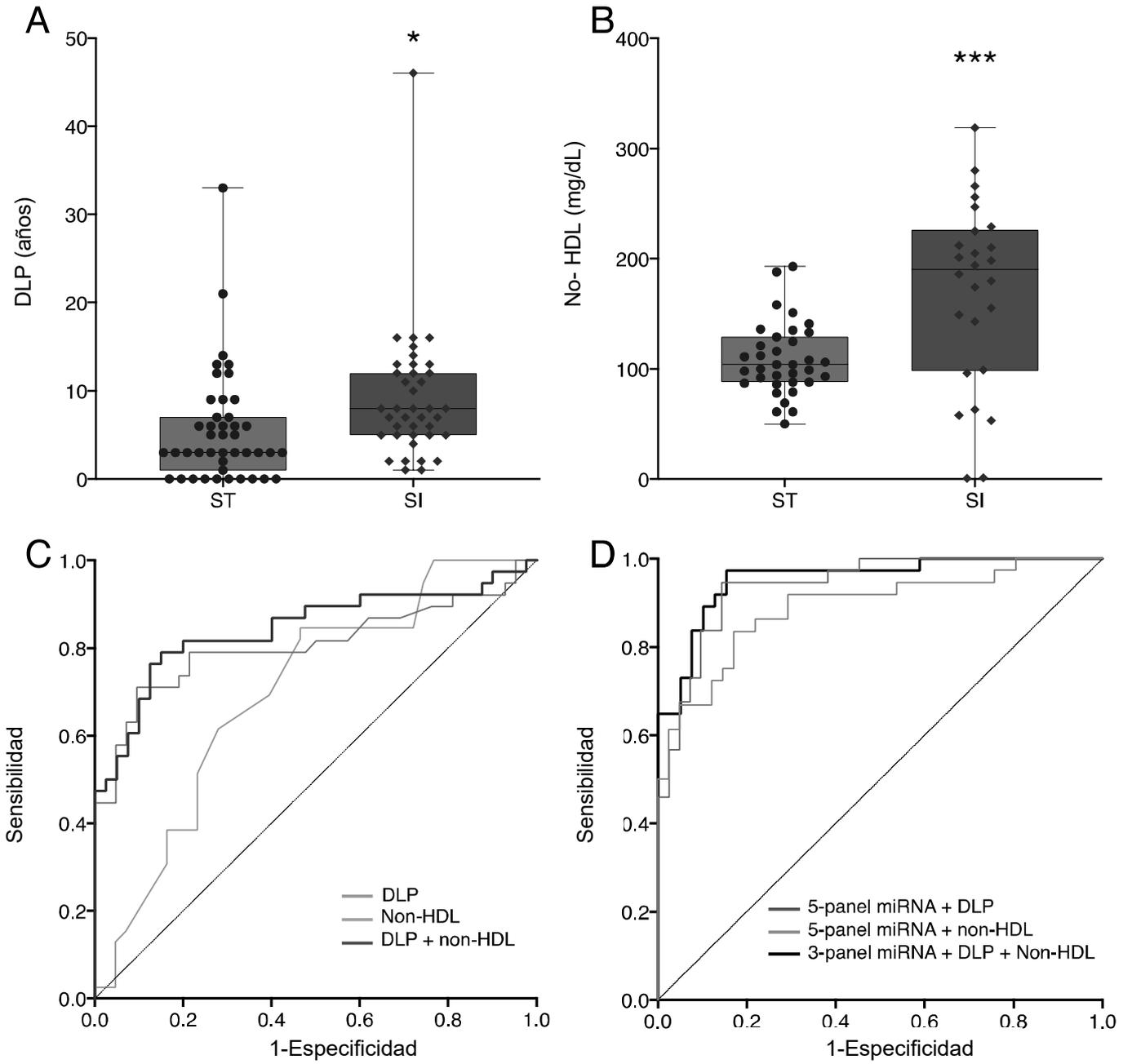


Fig. 4

A

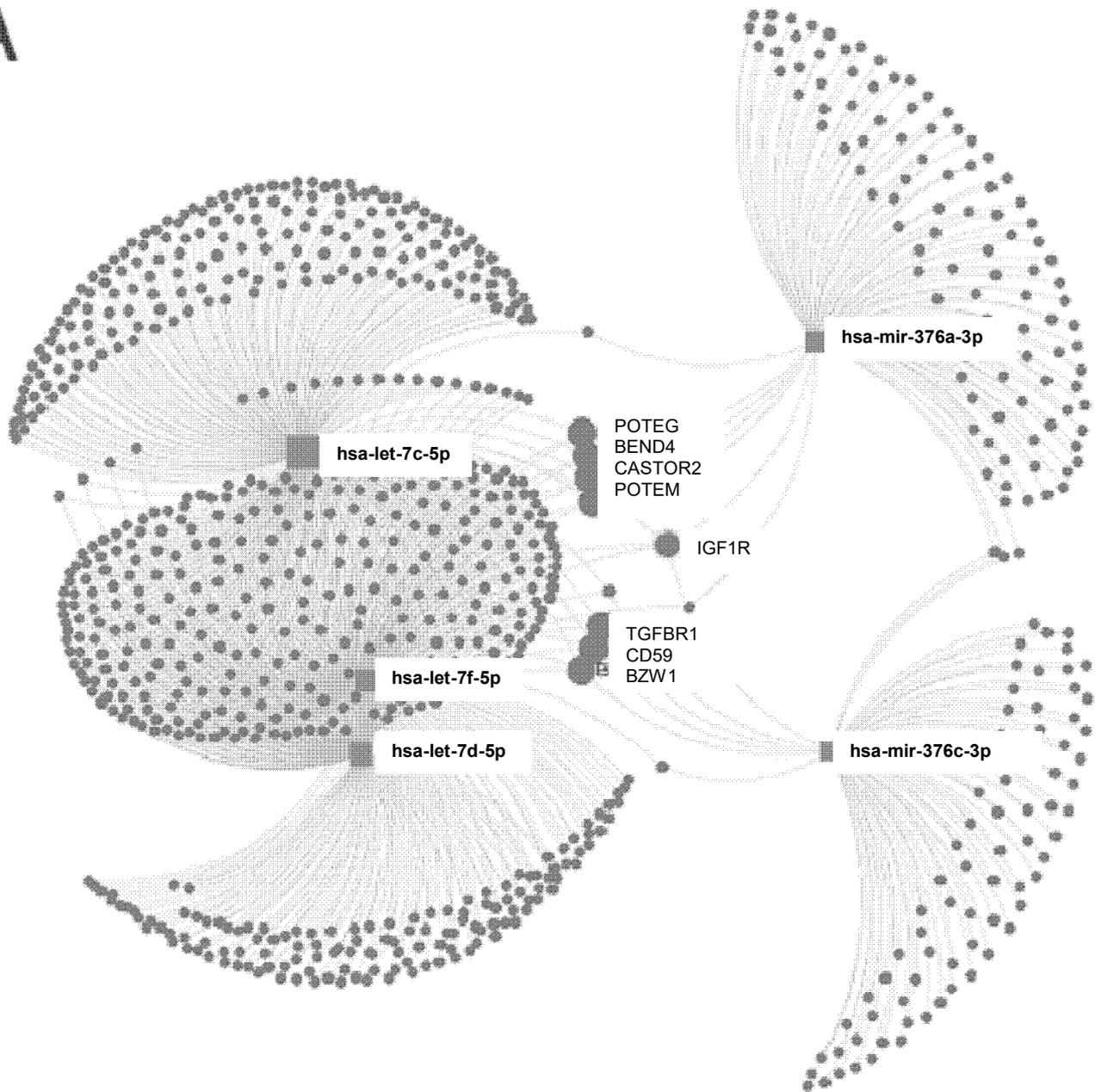


Fig. 5 A

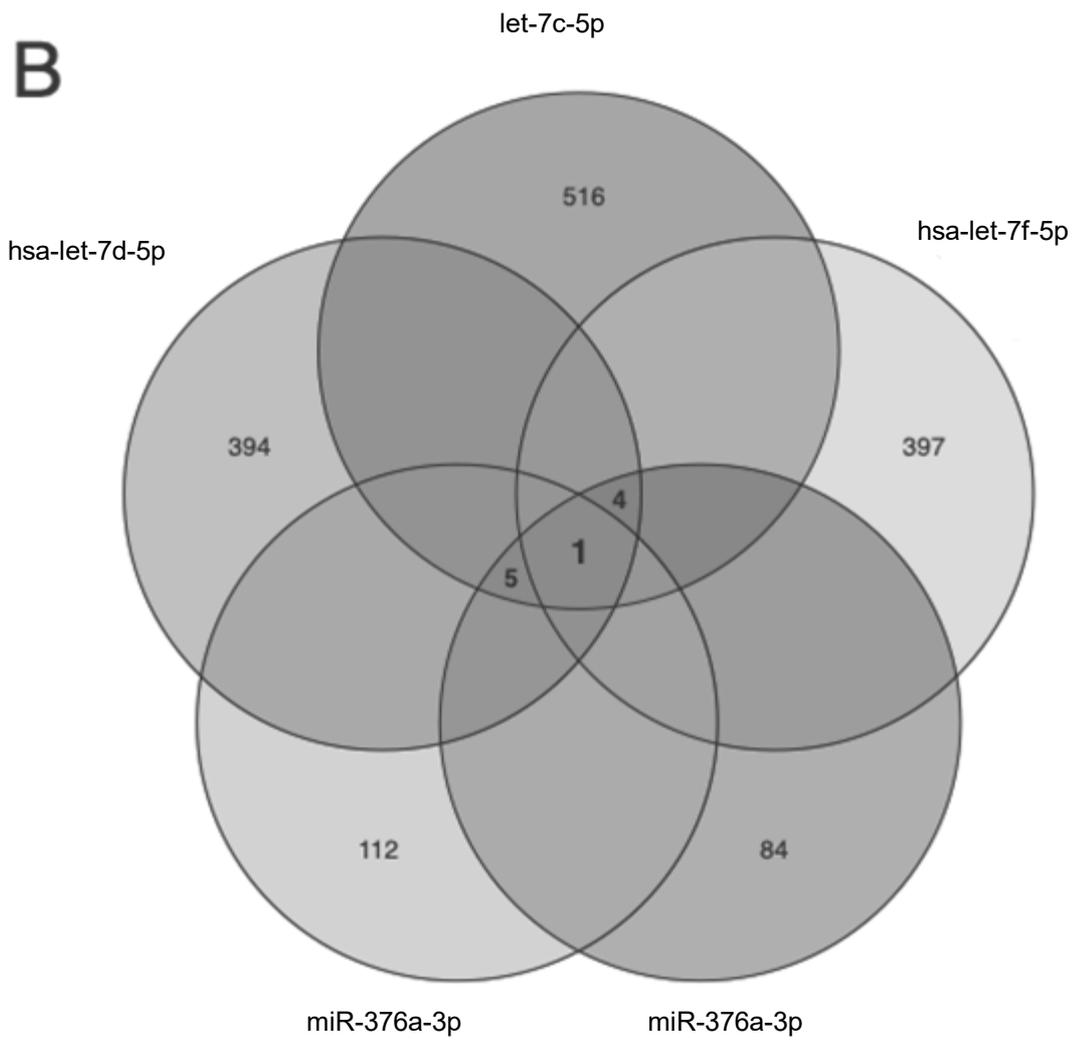
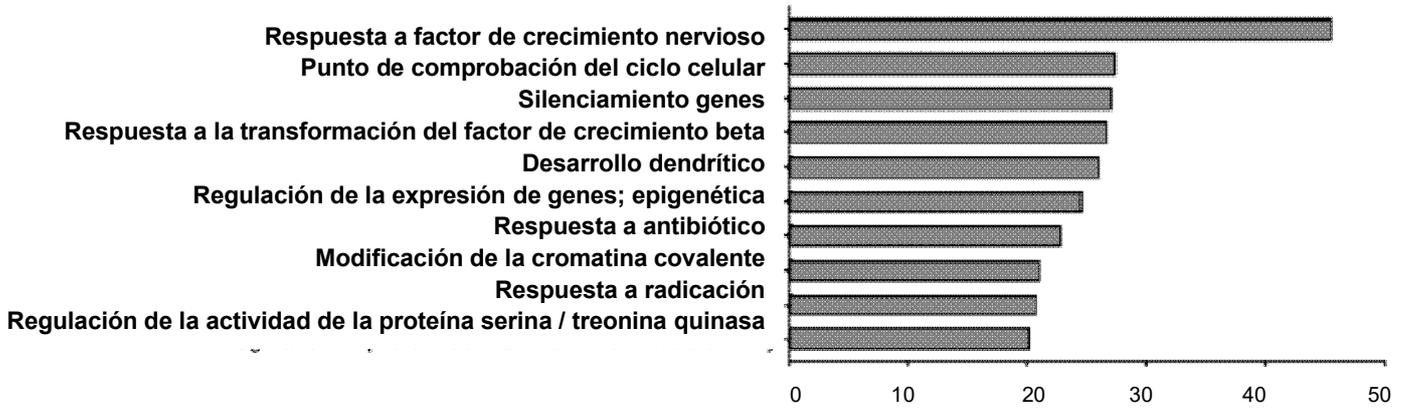


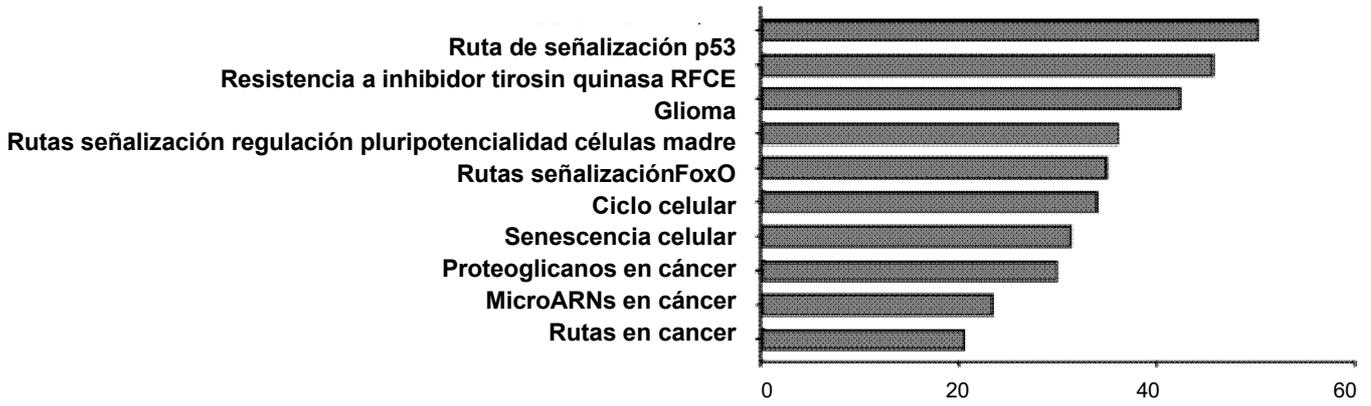
Fig. 5 B

Análisis enriquecido

Proceso biológico



KEGG



Enfermedad

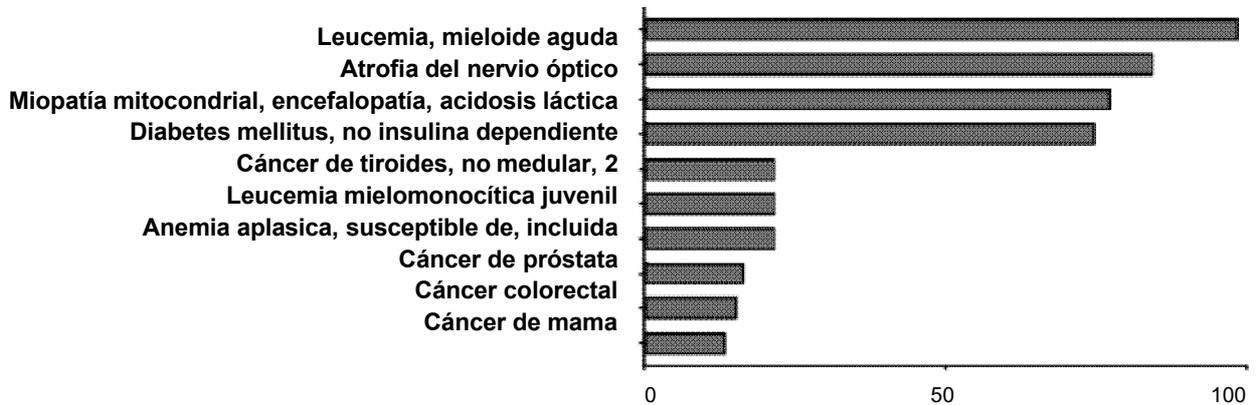


Fig. 5 C