

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 955**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008 E 08863936 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2232270**

54 Título: **Método de evaluación de riesgo de insuficiencia cardiaca**

30 Prioridad:

21.12.2007 US 8594 P

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

10.06.2013

73 Titular/es:

**MCMaster UNIVERSITY (100.0%)
MCMaster INDUSTRY LIAISON OFFICE MIP
SUITE 100 175 LONGWOOD ROAD SOUTH
HAMILTON, ONTARIO L8S 1A1, CA**

72 Inventor/es:

KAVSAK, PETER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 406 955 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 de evaluación de riesgo de insuficiencia cardíaca

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un método de pronóstico en el campo de la cardiología, y en particular, a un método de evaluación de riesgo de insuficiencia cardíaca o muerte en un mamífero.

Antecedentes de la Invención

10 Se ha demostrado que concentraciones moderadamente elevadas de Proteína C Reactiva (CRP), un marcador de inflamación, son predictivas de riesgo de insuficiencia cardíaca (HF) y muerte tanto a corto como a largo plazo pero no de infarto agudo de miocardio (AMI), en pacientes con síndromes coronarios agudos (ACS). Un informe reciente ha indicado también que concentraciones elevadas de CRP están asociadas con nueva insuficiencia cardíaca en pacientes sin ACS con enfermedad estable de las arterias coronarias. La CRP es una sustancia reaccionante de fase aguda, pero su concentración requiere tiempo para aumentar durante un evento agudo. Adicionalmente, las elevaciones no son específicas de la inflamación vascular. La interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina pro-inflamatoria que se cree es el estimulador próximo más importante para la CRP y estimula también la activación de los leucocitos. La interleuquina-8 (IL-8) y la Proteína-1 Quimioatrayente de los Monocitos (MCP-1) son ambas quimioquinas que reclutan neutrófilos y monocitos, respectivamente, al proceso inflamatorio. Se ha informado con anterioridad que concentraciones elevadas de IL-6 y MCP-1 son predictores independientes de muerte/HF en una población ACS; sin embargo, la inflamación representa solamente un proceso patológico en este escenario y biomarcadores adicionales que evalúen la fibrosis cardíaca, remodelación, función y supervivencia son importantes para la estratificación completa de los riesgos.

25 Tian *et al.* (Clin. Chem. 2006; 52:A139) describe la variación de citoquinas séricas en pacientes con estrés y enfermedades cardíacas coronarias. Guo *et al.* (Clin. Chem. 2005; 51:(s6):A119) describe la estabilidad e intervalos de referencia de citoquinas séricas y correlaciones entre citoquinas séricas, edades y sexos en una población sana utilizando tecnología de biochips. Fitzgerald *et al.* (J. Proteome Res. 2007; 7(1):450-455) describe la aplicabilidad de la tecnología de redes de biochips para medir simultáneamente 12 citoquinas humanas circulantes con detección de alta sensibilidad. Kavsak *et al.* (Clin. Chem. 2007; 53:2112-2118) expone que IL-6, MCP-1 y NT-proBNP son predictores independientes de muerte e insuficiencia cardíaca en una población de síndrome coronario agudo. Kavsak *et al.* (Clin Chem Acta 2008; 387:133-138) expone el uso de un panel de biomarcadores que incluyen IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF, L-selectina, P-selectina, E-selectina, VCAM-1, ICAM-1, cTnl y NT-proBNP para identificar pacientes en riesgo de infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca. Bimer *et al.* (2007; 40:89-97) expone el uso de IL-6 y NT-proBNP como biomarcadores de infarto de miocardio en humanos, y BNP e IL-6 como biomarcadores de insuficiencia cardíaca congestiva en animales. US 2006/094056 describe métodos para diagnóstico, tratamiento, o evaluación de enfermedades inflamatorias y autoinmunes por muestreo de fluidos corporales respecto a la presencia y cantidad de ciertas citoquinas, lo que facilita el diagnóstico, el pronóstico o la evaluación de una respuesta terapéutica.

35 Así pues, sería deseable desarrollar un método predictivo exacto del riesgo de muerte/insuficiencia cardíaca en un mamífero.

Sumario de la Invención

40 Se ha encontrado ahora que IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF pueden utilizarse colectivamente como biomarcadores para identificar mamíferos en riesgo de insuficiencia cardíaca o muerte, en donde un cambio en la concentración de al menos tres de estos biomarcadores en comparación con una línea base media es indicativo de un estado patológico.

45 Así pues, en un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de determinación del riesgo de insuficiencia cardíaca en un mamífero, que comprende determinar en una muestra biológica obtenida del mamífero el nivel de cada una de los biomarcadores IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF en la muestra, en donde un resultado positivo de al menos tres de dichos biomarcadores es indicativo de un riesgo de insuficiencia cardíaca en el mamífero y en donde un resultado positivo está representado por un aumento en la concentración de cualquiera de IL-6, MCP-1, IL-10, y EGF y una disminución en la concentración de EGF en la muestra en comparación con una concentración mediana de cada una de los biomarcadores en una población dada.

50 En otro aspecto de la invención, se estipula el uso de un kit para la práctica del método definido en esta memoria a fin de determinar el riesgo de insuficiencia cardíaca en un mamífero. El kit comprende una sustancia reaccionante específica de citoquinas para cada una de IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF, en donde cada una de dichas sustancias reaccionantes está asociada con un indicador capaz de dar lugar a un producto detectable que es indicativo de la concentración de la citoquina en una muestra biológica.

55 Estos y otros aspectos de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue y las figuras que se describen brevemente a continuación.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 ilustra curvas Kaplan-Meier para supervivencia exenta de eventos acumulativos (muerte/HF) para cada una de los biomarcadores, IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF (A-E) basada en análisis de cuartiles (siendo el Cuartil 1 el grupo de concentración mínima y el Cuartil 4 el grupo de concentración máxima); y

- 5 la Figura 2 ilustra curvas de supervivencia Kaplan-Meier para un grupo con tres-5 biomarcadores positivos en comparación con un grupo < 3 biomarcadores positivos.

Descripción Detallada de la Invención

10 Se proporciona un método de determinación del riesgo de insuficiencia cardiaca en un mamífero que comprende los pasos de medir el nivel de cada una de los biomarcadores IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF en una muestra biológica obtenida del mamífero. La determinación de un resultado positivo de al menos tres de estos biomarcadores es indicativa de un riesgo de insuficiencia cardiaca en el mamífero.

15 El término "IL-6" se refiere a la citoquina de mamífero Interleuquina-6, y abarca tanto IL-6 humana, como se representa por el nº de Acceso NCBI NP000591, así como IL-6 de otra especie de mamífero, por ejemplo IL-6 de ratón como se representa por el nº de Acceso NCBI NP112445. Se abarcan también compuestos semejantes a IL-6 tales como el miembro de la familia de citoquinas gp130 (v.g. gp130, LIF-IR (NP002301), OSM-R (Q99650), y G-CSF-R (NP000751), o un receptor de gp130 soluble (v.g., el receptor soluble de IL-6).

20 El término "MCP-1" se refiere a la Proteína-1 Quimioatrayente de los Monocitos, que es un miembro de la familia de genes inducibles pequeños (SIG) y es conocida también citoquina inducible pequeña A2 (SCYA2) y factor quimiotáctico y activador de los monocitos (MCAF). "MCP-1" como se utiliza en esta memoria abarca tanto MCP-1 humana, como se representa por el nº. de Acceso NCBI NP000591, así como MCP-1 de otras especies de mamífero, por ejemplo, MCP-1 de ratón como se representa por el nº de Acceso NCBI NP112445. Se abarcan también compuestos semejantes a MCP-1 tales como un compuesto de la familia de quimioquinas CC, v.g. CCL1-28, o un receptor del mismo.

25 El término "IL-10" se refiere a la interleuquina-10 de mamífero. IL-10 se conoce también como factor inhibidor de la síntesis de citoquinas humanas (CSIF) y es una citoquina anti-inflamatoria. "IL-10" abarca tanto IL-10 humana como se representa por el nº de Acceso NCBI NP000563, como IL-10 de otras especies de mamífero, por ejemplo IL-10 de ratón como se representa por el nº de Acceso NCBI NP034678. Se abarcan también compuestos semejantes a IL-10 tales como citoquinas pertenecientes a la superfamilia IL-10 extendida (v.g., la superfamilia IL-10 extendida: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, e IL-29) o un receptor de las mismas.

30 El término "VEGF" se refiere a los Factores de Crecimiento Endotelial Vascular de la familia de factores de crecimiento derivados de las plaquetas que incluye VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D y las variantes de remodelación VEGF₁₂₁, VEGF_{121b}, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. "VEGF", tal como se define abarca tanto VEGF humano, por ejemplo VEGF-A como se representa por el nº de Acceso NCBI NP001020537 y VEGF-B como se representa por el nº de Acceso NCBI XP001128909, y VEGF de otras especies de mamífero, por ejemplo, VEGF-A de ratón como se representa por el nº de Acceso NCBI NP001020421 y VEGF-B de ratón como se representa por el nº de Acceso NCBI NP035827. Se abarcan también compuestos semejantes a VEGF pertenecientes a la familia VEGF tales como PIGF (NP002634) y sVEGFR1 (o sFit-I).

40 El término "EGF" se refiere al Factor de Crecimiento Epidérmico de mamífero (conocido también como beta-uogastona), que incluye EGF humano, como se representa por el nº de Acceso NCBI NP001954, así como EGF de otras especies de mamífero, por ejemplo, EGF de ratón como se representa por el nº de Acceso NCBI NP034243. Se abarcan también compuestos semejantes a EGF pertenecientes a la familia EGF tales como HB-EGF (NP001936), sEGFR (NP005219) o HER2 soluble (NP001005862).

El término "mamífero" se utiliza en esta memoria para referirse a mamíferos tanto humanos como no humanos, con inscripción de animales domésticos, v.g. gatos, perros, y análogos, ganado y animales no domesticados.

45 En un primer paso del método, se obtiene una muestra biológica de un mamífero en riesgo de lesión miocárdica, v.g. mamíferos con síndromes coronarios agudos (ACS). Debe entenderse que el término "muestra biológica" abarca cualquier muestra de mamífero que contenga proteínas citoquina tales como IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, EGF y/o proteínas afines, v.g. proteínas afines tales como las arriba descritas, que pueden ser indicativas del nivel o concentración de una de IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF. Muestras biológicas adecuadas incluyen, por ejemplo, 50 sangre, suero, plasma y orina. La muestra se obtiene del animal de una manera bien establecida en la técnica.

Una vez que se obtiene una muestra biológica adecuada, se analiza la misma respecto al nivel de cada una de las proteínas citoquina IL-6, MCP-1, IL-10, EGF y VEGF. En caso necesario o preferible, puede analizarse una proteína afín en lugar de una cualquiera de IL-6, MCP-1, IL-10, EGF y VEGF. Esta determinación puede realizarse utilizando diversos métodos establecidos en la técnica, por ejemplo, por Ensayos con InmunoSorbente Unido a Enzima (ELISAs) o el InmunoEnsayo Enzimático (EIA). En este ensayo, la citoquina a analizar se compleja con una 55 sustancia reaccionante específica de citoquinas tal como un anticuerpo que está enlazado (sea antes o

subsiguientemente a la formación del complejo) a un indicador, tal como una enzima. La detección puede realizarse luego por incubación de este complejo enzimático con un sustrato, por ejemplo, que da lugar a un producto detectable. El indicador puede unirse directamente a la sustancia reaccionante (v.g. el anticuerpo) o a través de un enlazador, tal como un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primero o primario, o una proteína tal como estreptavidina si el anticuerpo primario está marcado con biotina. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero sin carácter limitante, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, acetilcolinesterasa y catalasa. Está disponible una amplia selección de sustratos para realización del ELISA con un conjugado de HRP o AP. Sustratos útiles dependen del nivel de detección requerido y la instrumentación de detección utilizada, v.g. espectrofotómetro, fluorómetro o luminómetro.

Un medio conveniente por el cual pueden determinarse los niveles de citoquinas en una muestra utiliza, por ejemplo, tecnología de redes de biochips. Generalmente, las redes de biochips proporcionan un medio para determinar simultáneamente el nivel de múltiples citoquinas en una muestra. Estas redes están basadas en principios ELISA de inmunoensayos sándwich o competitivos y, por tanto, el biochip proporciona una plataforma de reacción que incluye anticuerpos específicos de las citoquinas unidos a sitios predefinidos en la superficie. Generalmente se utiliza una cantidad de muestra biológica en el intervalo de aproximadamente 80-120 μ l para realizar esta determinación de los niveles de citoquinas utilizando el biochip.

Una determinación de una concentración de una cualquiera de IL-6, MCP-1, IL-10, y VEGF que es mayor que el nivel mediano de concentración de la población que se evalúa es un resultado positivo que es indicativo de riesgo de insuficiencia cardiaca, mientras que una determinación de un nivel de concentración de EGF que es menor que el nivel mediano de concentración de la misma población es un resultado positivo que es indicativo de insuficiencia cardiaca. Cuanto mayor es la diferencia de concentración de las citoquinas medidas con respecto al nivel mediano de concentración en una población dada (v.g. cuanto mayor es la concentración de IL-6, MCP-1, IL-10, y VEGF, y cuanto menor es la concentración de EGF respecto a la mediana), tanto mayor es el riesgo de insuficiencia cardiaca/muerte. Será comprendido por un experto en la técnica que el nivel mediano de concentración de estas citoquinas puede variar de una población a otra, lo cual podría incluir una población general para cribado o una población más específica de riesgo alto tal como una población con dolor torácico ED. De acuerdo con ello, la concentración de cada citoquina que califica como resultado positivo depende de una población dada y del nivel mediano de concentración de cada citoquina en dicha población. Mínimamente, cualquier aumento de VEGF, IL-6, IL-10, MCP-1 o disminución de EGF respecto a la concentración mediana, en tres cualesquiera de las citoquinas, es suficiente para dar un resultado positivo cuando se utiliza un enfoque de punto de corte (o dicotómico). Sin embargo, cuando los biomarcadores se tratan como variables continuas, la combinación de más de tres biomarcadores (véanse las Tablas 5 y 6) produce un riesgo significativamente mayor para insuficiencia cardiaca/muerte en comparación con aquéllas en las que se miden solamente dos biomarcadores.

El presente método es particularmente útil para determinar el riesgo de insuficiencia cardiaca en pacientes con dolor torácico, pacientes ACS, pacientes en tratamiento cardiotoxico (v.g., pacientes de cáncer que reciben fármacos cardiotoxicos y/o radiación en el tórax), pacientes diabéticos, pacientes con artritis reumatoide, pacientes con presión sanguínea elevada, pacientes obesos, y pacientes de edad mayor de 65 años.

Adicionalmente, el presente método es útil para determinar el riesgo de insuficiencia cardiaca en un mamífero con contusión cardiaca, u otros traumatismos que incluyen cirugía, extirpación, electroestimulación, etc.; insuficiencia cardiaca congestiva - aguda y crónica; disección aórtica; enfermedad de válvula aórtica; cardiomiopatía hipertrófica; taqui- o bradi-arritmias, o bloqueo cardiaco; síndrome de hinchamiento apical; rabiomiolisis con lesión cardiaca; embolia pulmonar, hipertensión pulmonar severa; insuficiencia renal; enfermedad neurológica aguda, con inscripción de derrame cerebral o hemorragia subaracnoidea; enfermedades infiltrantes, v.g., amiloidosis, hemocromatosis, sarcoidosis, y escleroderma; enfermedades inflamatorias, v.g. miocarditis o extensión miocárdica de endo-/pericarditis; y quemaduras, especialmente si afectan a más del 30% del área de la superficie corporal. Es útil también determinar el riesgo de insuficiencia cardiaca en mamíferos que están críticamente enfermos, especialmente con insuficiencia respiratoria o sepsis, y mamíferos que han sido sometidos a un esfuerzo extremo.

El uso de un kit para practicar el método descrito en esta memoria a fin de determinar el riesgo de insuficiencia cardiaca en un mamífero se estipula en un aspecto adicional de la invención. El kit comprende una sustancia reaccionante específica de citoquina para cada una de IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF (v.g. anticuerpos específicos para cada citoquina). Cada una de las sustancias reaccionantes está asociada con un indicador (v.g., una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, acetilcolinesterasa y catalasa) que es capaz de dar lugar a un producto detectable que es indicativo de la concentración de la citoquina en la muestra biológica, por ejemplo por reaccionar con un sustrato para dar lugar a un producto detectable.

Realizaciones de la invención se describen con referencia al ejemplo específico siguiente, que no debe interpretarse como limitante.

Ejemplo 1**Métodos y Materiales**

Población de estudio

5 La población de estudio y sus características han sido consignadas previamente en Kavsak *et al.* (Clin Chem. 2007; 53-2112-2118).

10 En el momento de inscripción en el estudio, 448 pacientes singulares consecutivos que se presentaron en el departamento de urgencias de un hospital comunitario con síntomas sugerentes de isquemia cardiaca se reclutaron para un estudio retrospectivo de marcadores cardiacos. Se solicitó el tiempo de aparición de los síntomas y se recogieron muestras de sangre (sangre anticoagulada con EDTA y con heparina de todos los pacientes) a intervalos especificados (es decir, cada hora desde el momento de comienzo de los síntomas hasta las 6 horas, y luego a las 9, 12, 24 y 48 horas) hasta que el paciente recibió el alta, renunció a su participación ulterior, o fue retirado del estudio por los responsables de su cuidado. Todos los especímenes se congelaron, predominantemente a -70°C. Los especímenes anticoagulados con heparina se descongelaron y se realizaron medidas de troponina cardiaca I (cTnI) y CRP en los instrumentos Access® (ensayo AccuTnI) e Immage® (ensayo CRP de alta sensibilidad), respectivamente, de Beckman Coulter Inc. La estabilidad de troponina I y CRP se confirmó previamente en el grupo. Para el estudio presente, se seleccionaron únicamente aquellos individuos (n = 216) que tenían al menos dos especímenes anticoagulados con EDTA disponibles almacenados. El número mediano (percentiles 25^o-75^o) de especímenes por individuo era 3 (2-5) y todos los especímenes (n = 723) se midieron respecto a IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, EGF y NT-proBNP para proporcionar un perfil seriado y temporal de los biomarcadores. Para el análisis de los resultados, se seleccionaron sólo dos especímenes por individuo, basados en los criterios siguientes: el más temprano disponible (especimen 1^o) y el siguiente más próximo a las 9 horas después del comienzo (especimen 2^o). En el caso de que el espécimen primero se obtuviera más de 6 horas después del comienzo, se seleccionó entonces el espécimen siguiente al menos tres horas más tarde como el espécimen 2^o. Por tanto, el intervalo mínimo entre los pares de especímenes era 3 horas, siendo la mediana (25^o-75^o) 6,5 horas (5-8).

25 Medidas de biomarcadores

Los especímenes en EDTA se descongelaron y se midió una serie de citoquinas utilizando la plataforma de biochips Evidence Investigator™ (Randox Ltd.). El biochip puede ensayar 12 citoquinas; sin embargo, se evaluaron solamente IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF para el presente estudio de evaluación de la utilidad de estos 5 marcadores para predicción de insuficiencia cardiaca o muerte en una población de riesgo por lesión miocárdica (es decir, una población ACS). La imprecisión (CV) del interensayo (n = 20 ensayos), determinada por medida de 3 niveles de material de control de calidad, estaba comprendida entre 9,2 y 13,2% para IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF. El NT-proBNP se midió con el instrumento Elecsys® 1010 (Roche) con impresión de interensayo < 7%.

Interpretación del test de paneles

35 Los 5 biomarcadores: IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF pueden tener funciones biológicas diferentes y quizás papeles diferentes que pueden ser sinérgicos y/o complementarios unos de otros, lo que aumenta el riesgo para los pacientes respecto a muerte/HF subsiguiente. Debido a ello, se tomó la decisión de registrar cada biomarcador como sigue: si la concentración de IL-6 es > la concentración mediana, se etiqueta este test como positivo; si la concentración de IL-10 es > la concentración mediana, se etiqueta este test como positivo; si la concentración de VEGF es > la concentración mediana, se etiqueta este test como positivo; si la concentración de MCP-1 es > la concentración mediana se etiqueta entonces este test como positivo; si la concentración de EGF es < (menor que) la concentración mediana, se etiqueta este test como positivo. Después de registrar cada una de los 5 biomarcadores en la misma muestra (es decir, muestra 2^a - 9 h después del comienzo del dolor), se creó una variable nueva. Se registró el número de tests positivos por individuo (0-5 tests positivos/individuo). Los individuos con 3 o más tests positivos se compararon con los de 0-2 tests positivos respecto a muerte/HF. Adicionalmente, se empleó otro enfoque que evaluaba las diferentes contribuciones individuales para cada biomarcador para predicción del resultado, permitiendo así que una persona determinara si existía una reacción sinérgica entre los 5 biomarcadores en el panel para predecir la muerte/HF a largo plazo en comparación con modelos que incluían sólo dos biomarcadores.

Resultados de salud y Análisis estadístico

50 Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de investigación para medir los biomarcadores en las muestras guardadas y realizar enlaces de los resultados de salud con la Base de Datos de Personas Registradas (RPDB) para resultados de mortalidad y la Base de Datos de Resúmenes de Altas de Instituto Canadiense para Información de Salud (CIHI-DAD) para altas hospitalarias asociadas con HF. Se ha publicado que tanto RPDB como CIHI-DAD (es decir, las bases de datos administrativas) son muy exactas en lo que respecta a la obtención de estos puntos finales. Basándose en la fecha de muerte y la readmisión subsiguiente más temprana por HF, se crearon indicadores para reflejar si un evento (muerte o readmisión por HF) ocurría o no dentro de 8 años después de la presentación (los pacientes que murieron sin la readmisión previa por HF o seguimiento se censaron en la fecha de muerte). Las concentraciones de biomarcadores (v.g. IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, EGF) en el espécimen último (es

decir el 2º) se utilizaron para determinar el riesgo basado en la hipótesis de que este espécimen reflejaría mejor la gravedad de la disfunción de los cardiomiocitos y la respuesta inflamatoria del paciente que el espécimen anterior. Es digno de mención que los análisis exploratorios que utilizaban modelos logísticos de regresión con las citoquinas para el punto final combinado muerte/HF sugerían que no había diferencia alguna en los resultados a largo plazo (v.g., a los 8 años) entre el espécimen 1º y el 2º; sin embargo, el 2º espécimen tendía a ser más predictivo para los resultados tempranos (v.g., 30 días y 1 año) en comparación con el espécimen 1º (véase Tabla 1).

Tabla 1 - Análisis de regresión logística para muerte/HF por los biomarcadores en el espécimen 1º (Tiempo 1) y el espécimen 2º (Tiempo 2).

Resultado compuesto (muerte/HF)	Marcador	AUC	
		Tiempo 1	Tiempo 2
1 año	il6	0,735	0,759
	il10	0,723	0,754
	vegf	0,758	0,763
	mcp1	0,732	0,735
	egf	0,721	0,722
30 días	il6	0,67	0,727
	il10	0,654	0,719
	vegf	0,645	0,646
	mcp1	0,659	0,674
	egf	0,645	0,647

(Nota: Los modelos se ajustaron por edad y sexo)

El análisis de cuartiles para cada uno de los biomarcadores, de modo univariante, se realizó por el método Kaplan-Meier. Resumidamente, basándose en la fecha de muerte y la readmisión subsiguiente más temprana por insuficiencia cardiaca (HF), se crearon indicadores que reflejaran si ocurría o no un evento (muerte o readmisión por HF) en el transcurso de 8 años después de la presentación (los pacientes que murieron sin readmisión previa para HF o seguimiento se censaron en la fecha de muerte). Las concentraciones de biomarcadores en el espécimen último (es decir el 2º) se utilizaron para el análisis de cuartiles para IL-6, VEGF, MCP-1, IL-10 y EGF. Cuando se combinaron los biomarcadores, los análisis se basaron en las clasificaciones siguientes: los individuos con 0-2 tests positivos frente a aquéllos que presentaban 3-5 tests-positivos. Para la población de este estudio (n = 216), se utilizó el punto final combinado (muerte/HF) para todos los análisis a fin de maximizar el número de eventos. Se construyeron curvas Kaplan-Meier para presentar el tiempo hasta un evento (muerte/HF), con diferencias entre grupos evaluadas por el test "log rank". Se utilizó el modelo de riesgo proporcional de Cox para comparar el tiempo hasta un evento para aquéllos de ≥ 3 tests positivos (3-5 test positivos) frente a aquéllos que presentaron < 3 tests positivos (0-2 tests positivos). Se utilizaron diferentes modelos para evaluar el riesgo asociado con aquellos individuos que presentaban ≥ 3 tests positivos: el modelo 1 ajusta respecto a edad (variable continua), sexo, historia o HF, mientras que el modelo 2 ajusta en cuanto a edad (variable continua), sexo, historia de HF, NT-proBNP con relación a la mediana, y niveles de cTnI. Se utilizaron también los modelos de riesgo proporcional de Cox para evaluar la posibilidad de combinaciones de IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF y EGF y sus interacciones para predecir muerte/HF. Se construyeron modelos para IL-6 sola, IL-6 y MCP-1 (con sin interacción), IL-6 y EGF (con y sin interacción), IL-6 y VEGF (con y sin interacción), IL-6 e IL-10 (con y sin interacción), y se compararon con modelos que incluían combinaciones de la totalidad de los 5 marcadores (con y sin interacciones). Para cada una de estos modelos, se determinó el ratio de probabilidad así como la significación de la asociación basada en la estadística chi cuadrado de Wald ($p < 0,05$). Las comparaciones de tendencia central entre grupos estaban basadas en los tests de Wilcoxon y Kruskal-Wallis. Los análisis se realizaron utilizando la versión SAS 9.1.3 y la versión Graph Pad Prism 5.00.

Resultados

Para los 216 individuos (61% varones), la edad mediana (percentil 25º-75º) era 66 años (53-76). En el momento de inscripción en el estudio en 1996, el 19,4% de los individuos se diagnosticaron de infarto agudo de miocardio basado en los criterios WHO MONICA (Kavsak et al. Clin Chem. 2007; 53:2115). La aplicación de los criterios ECS/ACC retrospectivamente basados en las concentraciones pico de cTnI dio como resultado 44,4% de individuos que tenían una concentración de cTnI $>$ el percentil 99º ($> 0,04 \mu\text{g/l}$) (Kavsak et al. Clin Chem. 2007; 53:2115). Se han consignado previamente aumentos en la concentración tanto de NT-proBNP como de IL-6 en el espécimen 2º; sin embargo, en el presente análisis, las concentraciones tanto de VEGF como de IL-10 disminuían en el espécimen

2 (mediana 9 h después del comienzo) en comparación con el espécimen 1º (mediana 2 h después del comienzo), sin cambio alguno en las concentraciones de EGF entre los dos momentos puntuales (Tabla 2).

Tabla 2 - Características bioquímicas [es decir, mediana (percentil 25º-75º)] para el conjunto de especímenes^s

<u>Variable</u>	<u>Especimen 1º</u>	<u>Especimen 2º</u>	<u>Valor D</u>
Tiempo desde el comienzo, h	2 (2-4)	9 (9-9)	
IL-6 (ng/l)	4,0 (1,8-11,5)	6,4 (2,8-17,0)	<0,001
MCP-1 (ng/l)	150 (116-202)	155 (114-203)	0,102
IL-10 (ng/l)	0,0 (0,0-1,4)	0,0 (0,0-1,1)	0,006
VEGF (ng/l)	24,2 (14,5-48,1)	13,8 (0,0-33,8)	<0,001
EGF (ng/l)	5,9 (2,8-12,7)	5,0 (2,3-12,2)	0,311

^aNota: los pares de especímenes están separados al menos tres horas, como máximo 12 horas.

5 El análisis de la correlación de Spearman entre la totalidad de los 5 biomarcadores en el espécimen 2º reveló que IL-6 era el marcador con la correlación máxima, en tanto que EGF era el que presentaba la correlación mínima. Sin embargo, ninguna de los biomarcadores estaba fuertemente correlacionado ($r < 0,40$) (Tabla 3) y las curvas Kaplan-Meier indicaban que las mayores concentraciones (de modo univariante) para IL-6, VEGF, MCP-1 e IL-10 son indicativas de mayor probabilidad de insuficiencia cardiaca/muerte, en tanto que los individuos con concentraciones mayores de EGF presentaban menos eventos (menor probabilidad) (Figura 1).

10 **Tabla 3. Correlación de Spearman para los 5 marcadores en el espécimen 2º**

(es decir, 9 horas después del comienzo del dolor, n = 216)

	IL6	IL10	VEGF	MCP1	EGF
IL6		0,35	0,20	0,39	-0,05
IL10	0,35		0,12	0,16	-0,03
VEGF	0,20	0,12		0,06	0,19
MCP1	0,39	0,16	0,06		0,05
EGF	-0,05	-0,03	0,19	0,05	

p<0,05

15 Análisis adicionales que utilizaron un ensayo más sensible de troponina cardiaca (es decir, cTn de alta sensibilidad), con medición en el intervalo ng/l, no detectaban tampoco diferencias entre el grupo con tres-5 valores positivos frente al grupo < 3 valores positivos ($p = 0,63$ para la medida hs-cTnI más temprana entre los grupos y $p = 0,52$ para la medida hs-cTnI pico entre los grupos).

20 El análisis Kaplan-Meier de evaluación de individuos con 3 o más tests positivos frente a aquellos que presentaban menos de 3 tests positivos (es decir, 3-5 positivos frente a < 3 tests positivos) en el último espécimen (es decir, el espécimen 2º) demostró que aquellos con 3 o más tests positivos tenían una mayor probabilidad de muerte/HF a lo largo de los 8 años siguientes a la presentación en el departamento de urgencias (Figura 2). Es digno de mención, que no había diferencia alguna en las concentraciones de cTnI y NT-proBNP entre el grupo con tres-5 valores positivos frente al grupo con < tres valores positivos ($p = 0,091$ y $p = 0,987$, respectivamente) y la proporción de valores frente a mujeres en el grupo con tres-5 valores positivos tampoco era diferente (44% frente a 49%, $p = 0,48$).

25 Los modelos de riesgo proporcional de Cox ajustados por edad, sexo, e historia de HF, producían ratios de riesgo significativas para el grupo con tres-5 valores positivos frente al grupo con < tres valores positivos a los 6 meses, 2 años y 8 años. Incluso después de ajustar por concentraciones de NT-proBNP y cTnI en el análisis, el grupo con tres-5 valores positivos presentaba todavía ratios de riesgo significativas en los 3 momentos (Tabla 4).

Tabla 4. Ratios de Riesgo para muerte/HF a los 6 meses, 2 años, y 8 años. Modelos de riesgo proporcional de Cox para el grupo con tres-5 valores positivos frente al grupo con < tres valores positivos.

Modelo	Tiempo desde la presentación	HR con relación a <3 tests positivos	95%CL Inferior	95%CL Superior	Valor p de Chi cuadrado
1	6 meses	3,755	1,585	8,896	0,003
	2 años	3,054	1,639	5,693	<0,001
	8 años	2,729	1,795	4,148	<0,001
2	6 meses	3,171	1,327	7,579	0,009
	2 años	2,581	1,371	4,858	0,003
	8 años	2,736	1,788	4,185	<0,001

El modelo 1 ajusta respecto a edad en la presentación, sexo, o historia de insuficiencia cardiaca

El modelo 2 ajusta respecto a edad en la presentación, sexo, historia de insuficiencia cardiaca, NT-proBNP con relación a la mediana, y niveles de cTnl.

5 Para evaluar si la combinación de los 5 marcadores (que representan un panel de biomarcadores implicados en inflamación, fibrosis cardiaca y función de los cardiomiocitos) podría proporcionar un modelo que predijera mejor los resultados, se comparó el panel de los 5 biomarcadores con diferentes combinaciones de 2 biomarcadores. Como se ve en la Tabla 5, el panel de los 5 biomarcadores era un mejor predictor para muerte/HF comparado con los diferentes modelos de combinación de 2 biomarcadores.

Tabla 5. Modelos de riesgo proporcional de Cox para evaluación de las combinaciones de los 5 biomarcadores frente a modelos con sólo 2 biomarcadores para muerte/HF a los 8 años.

Modelo	Marcadores en el modelo	Ratio de Probabilidad Chi cuadrado	Grados de libertad	Modelos comparados	Valor P para diferencia en Chi cuadrado
1	IL-6 sólo	16,500		Referencia	
2	IL-6, MCP-1	19,300	2	2 frente a 1	0,094
3	IL-6, EGF	16,656	2	3 frente a 1	0,693
4	IL-6, VEGF	21,781	2	4 frente a 1	0,022
5	IL..S, IL-10	21,134	2	5 frente a 1	0,031
11	IL-6, MCP-1, EGF, VEGF, IL-10	30,218	5		
	diferencia en LR	13,718	4	11 frente a 1	0,005<p<0,010
	diferencia en LR	10,918	3	11 frente a 2	0,010<p<0,025
	diferencia en LR	13,562	3	11 frente a 3	p<0,005
	diferencia en LR	8,437	3	11 frente a 4	0,025p<0,50
	diferencia en LR	9,084	3	11 frente a 5	0,025p<0,050

(Nota: los biomarcadores se trataron como variables continuas en el modelo; por tanto, la Ratio de Probabilidad Chi cuadrado se refiere a la bondad con que el modelo predice el resultado, por lo que no importa la dirección de la asociación. Los valores p están asociados con la diferencia EN la ratio de probabilidad de Chi cuadrado (LR) entre los modelos).

10 Además, cuando se evaluó si la interacción entre los biomarcadores mejoraba significativamente el modelo, 4 biomarcadores demostraron superioridad respecto a las combinaciones de 2 biomarcadores (véase Tabla 6). Por tanto, la totalidad de los 5 biomarcadores (o dos combinaciones de 4 biomarcadores con inscripción de los términos de interacción) producen modelos que son superiores a las combinaciones de 2 biomarcadores como se evidencia por las mayores ratios de probabilidad.

Tabla 6. Modelos de riesgo proporcional de Cox para evaluar la combinación e *interacción* de 4 biomarcadores frente a modelos con sólo 2 biomarcadores para muerte/HF a los 8 años

Modelo	Marcadores en el modelo	Ratio de Probabilidad Chi cuadrado	Grados de Libertad	Modelos comparados	Valor P-para la diferencia en Chi cuadrado
2a	IL-6, MCP-1 + interxn	22,684	3		
3a	IL-6, EGF + interxn	22,048	3		
4a	IL-6, VEGF + interxn	21,834	3		
5a	IL-6, IL-10 + interxn	21,545	3		
9a	IL-6, MCP-1, EGF, VEGF + interxn	48,183	15		
	diferencia en LR	25,499	12	9a frente a 2a	0,010<p<0,025
	diferencia en LR	26,135	12	9a frente a 3a	0,010<p<0,025
	diferencia en LR	26,349	12	9a frente a 4a	0,005<p<0,010
10a	IL-6, MCP-1, EGF, IL-10 + interxn	49,249	15		
	diferencia en LR	26,565	12	10a frente a 2a	0,005<p<0,010
	diferencia en LR	27,201	12	10a frente a 3a	0,005<p<0,010
	diferencia en LR	27,704	12	10a frente a 5a	0,005<p<0,010

(Nota: los biomarcadores se trataron como variables continuas en el modelo; por tanto, la Ratio de Probabilidad Chi cuadrado se refiere a la bondad con que el modelo predice el resultado. Los valores p están asociados con la diferencia en la ratio de probabilidad de Chi cuadrado (LR) entre los modelos).

- 5 El presente estudio confirma que IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF y EGF son colectivamente eficaces como biomarcadores en la determinación del riesgo de insuficiencia cardiaca en un paciente. Estos biomarcadores actúan sinérgicamente para indicar un riesgo incrementado de insuficiencia cardiaca en un paciente, por lo que una determinación de un resultado positivo de al menos tres de estos biomarcadores proporciona un riesgo de insuficiencia cardiaca mayor que el aditivo en comparación con la determinación de sólo 2 biomarcadores (v.g. se indica al menos un riesgo 1,5 veces mayor con un resultado positivo de 4 de los biomarcadores comparado con el riesgo asociado con un resultado positivo de sólo dos biomarcadores como se muestra en la Tabla 6).
- 10 Los marcadores se midieron poco tiempo después del comienzo del dolor en un momento en el que los mismos tenían papeles en la activación y el reclutamiento de leucocitos durante el proceso inflamatorio, así como efectos sobre el proceso de fibrosis y la función de los miocitos al principio del proceso de lesión. Así, los papeles biológicos de los 5 biomarcadores, junto con su interacción, proporcionan un panel de biomarcadores que puede utilizarse de una manera dependiente el tiempo para proporcionar una herramienta poderosa para la identificación tanto de
- 15 hombres como de mujeres que se encuentran en riesgo de insuficiencia cardiaca y muerte subsiguientes. Todos los 5 biomarcadores parecen tener funciones diferentes y complementarias durante inflamación, fibrosis cardiaca, y funcionamiento del corazón, por lo que el panel proporciona una oportunidad para un efecto dependiente de la dosis (es decir, efecto graduado) a utilizar en los cálculos de riesgo por muerte/HF (v.g. 5 biomarcadores son mejores que 2 biomarcadores como se muestra en la Tabla 5).
- 20 Así pues, el uso del panel de 5 biomarcadores poco tiempo después de la identificación de lesión cardiaca o en aquéllos que presentan un riesgo elevado de lesión (sea debida a causas isquémicas o no isquémicas) puede identificar a aquéllos que presentan mayor riesgo de muerte/HF.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de determinación del riesgo de insuficiencia cardíaca en un mamífero que comprende determinar en una muestra biológica obtenida del mamífero el nivel de cada una de los biomarcadores IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF, y EGF en la muestra, en donde un resultado positivo de al menos tres de dichos biomarcadores en la muestra es indicativo de un riesgo de insuficiencia cardíaca en el mamífero y en donde un resultado positivo está representado por un aumento en la concentración de cualquiera de IL-6, MCP-1, IL-10 y VEGF, y una disminución en la concentración de EGF en la muestra en comparación con una concentración mediana de cada una de los biomarcadores en una población dada.
- 10 2. Un método como se define en la reivindicación 1, en donde la concentración de cada biomarcador se determina utilizando una sustancia reaccionante específica de citoquina para cada biomarcador, en donde cada una de dichas sustancias reaccionantes está asociada con un indicador capaz de dar lugar a un producto detectable que es indicativo de la concentración de la citoquina en la muestra biológica.
3. Un método como se define en la reivindicación 2, en donde la sustancia reaccionante específica de la citoquina es un anticuerpo.
- 15 4. Un método como se define en la reivindicación 2, en donde el indicador es una enzima capaz de reaccionar con un sustrato para dar lugar a un producto detectable.
5. Un método como se define en la reivindicación 1, en donde un resultado positivo en al menos 4 de dichos biomarcadores es indicativo de un mayor riesgo de insuficiencia cardíaca que un resultado positivo en 3 de dichos biomarcadores.
- 20 6. Un método como se define en la reivindicación 1, en donde cuanto mayor es el resultado positivo de uno o más de dichos al menos tres biomarcadores, tanto mayor es el riesgo de insuficiencia cardíaca.
7. Uso de un kit para practicar el método de la reivindicación 1, en donde dicho kit comprende una sustancia reaccionante específica de citoquina para cada una de IL-6, MCP-1, IL-10, VEGF y EGF, en donde cada una de dichas sustancias reaccionantes está asociada con un indicador capaz de dar lugar a un producto detectable que es indicativo de la concentración de la citoquina en una muestra biológica.
- 25 8. El uso como se define en la reivindicación 7, en donde la sustancia reaccionante específica de citoquina es un anticuerpo.
9. El uso como se define en la reivindicación 7, en donde el indicador es una enzima capaz de reaccionar con un sustrato para dar lugar a un producto detectable.
- 30 10. El uso como se define en la reivindicación 9, en donde la enzima se selecciona del grupo constituido por peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, acetilcolinesterasa y catalasa.

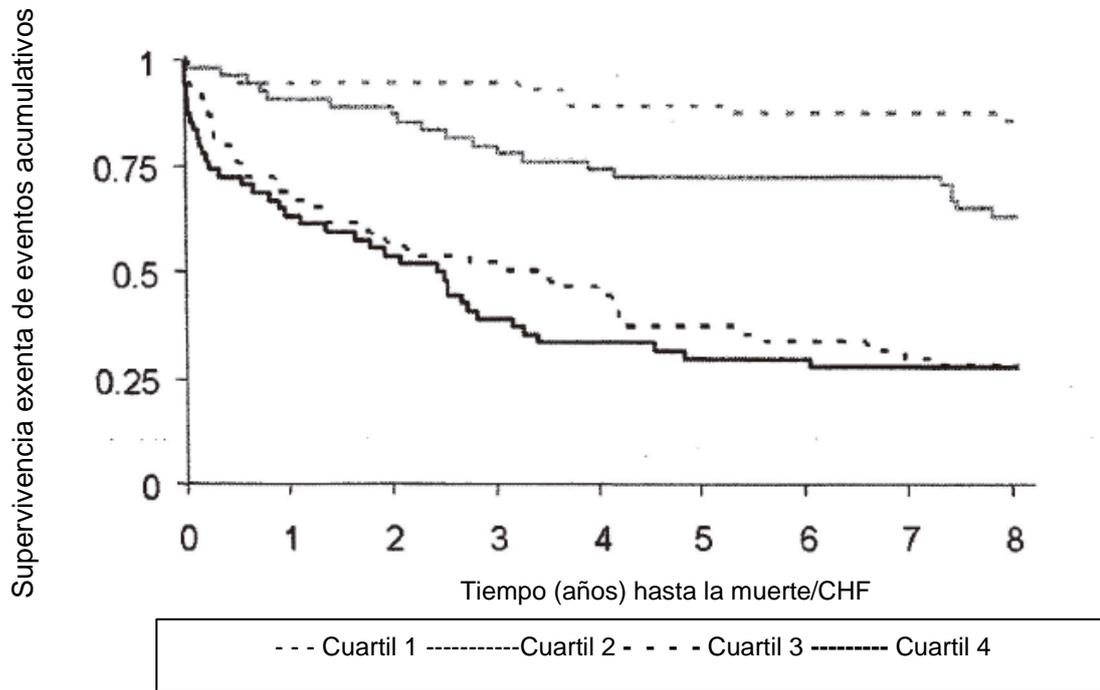


Fig. 1A

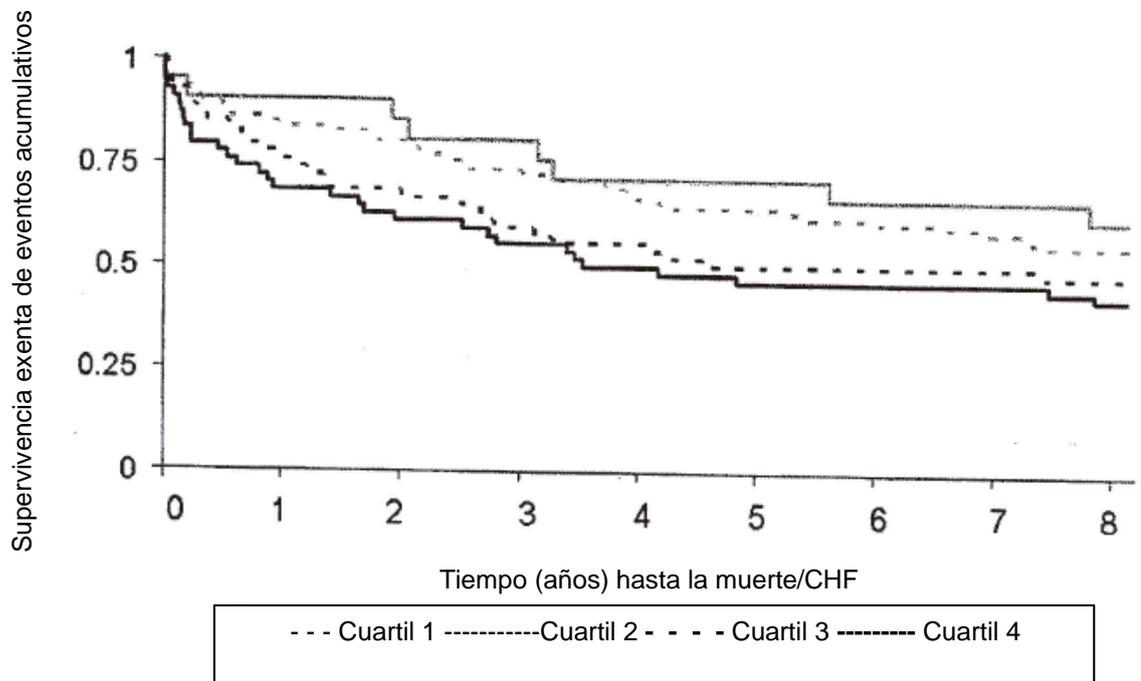


Fig. 1B

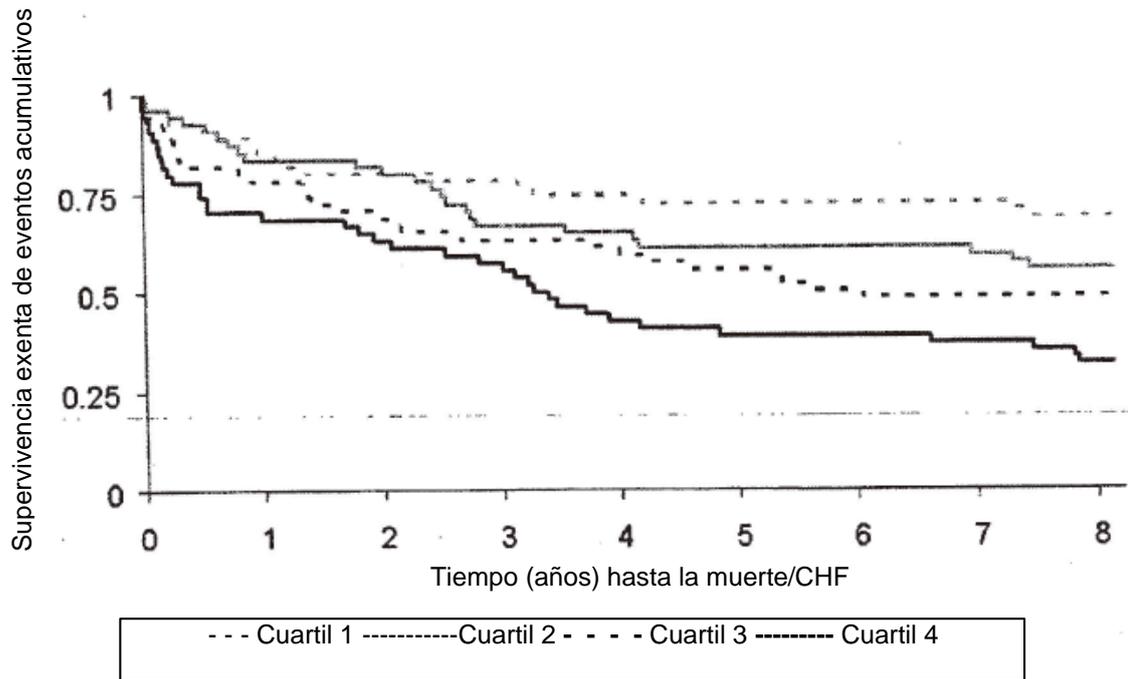


Fig. 1C

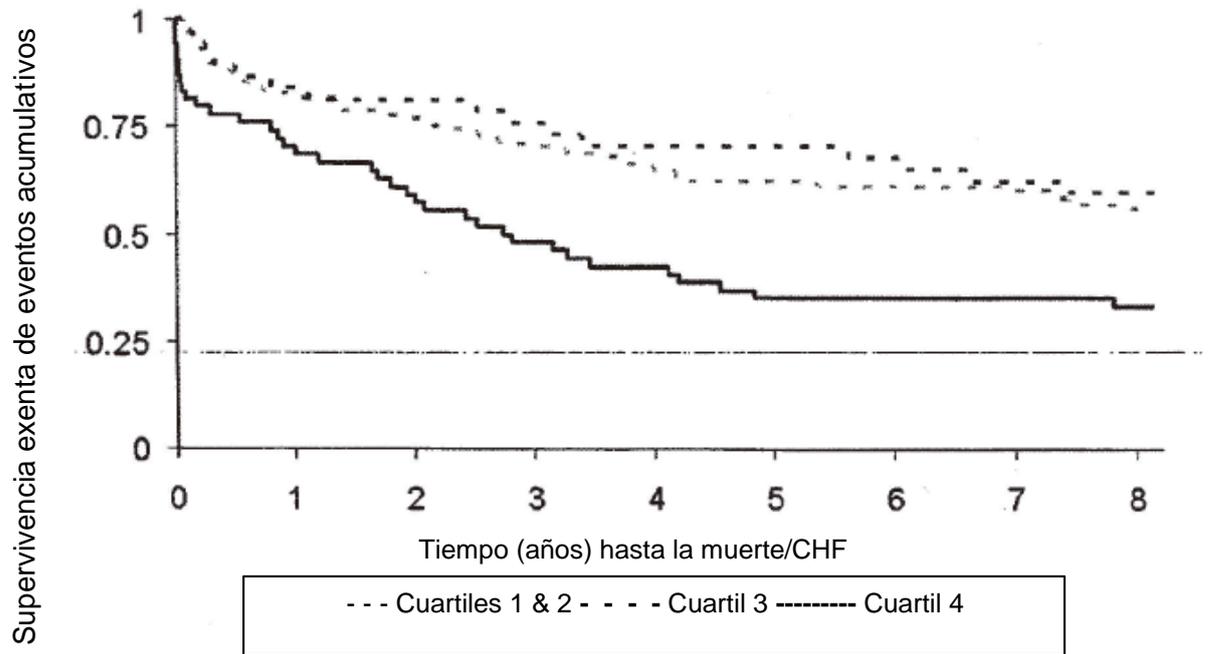


Fig. 1D

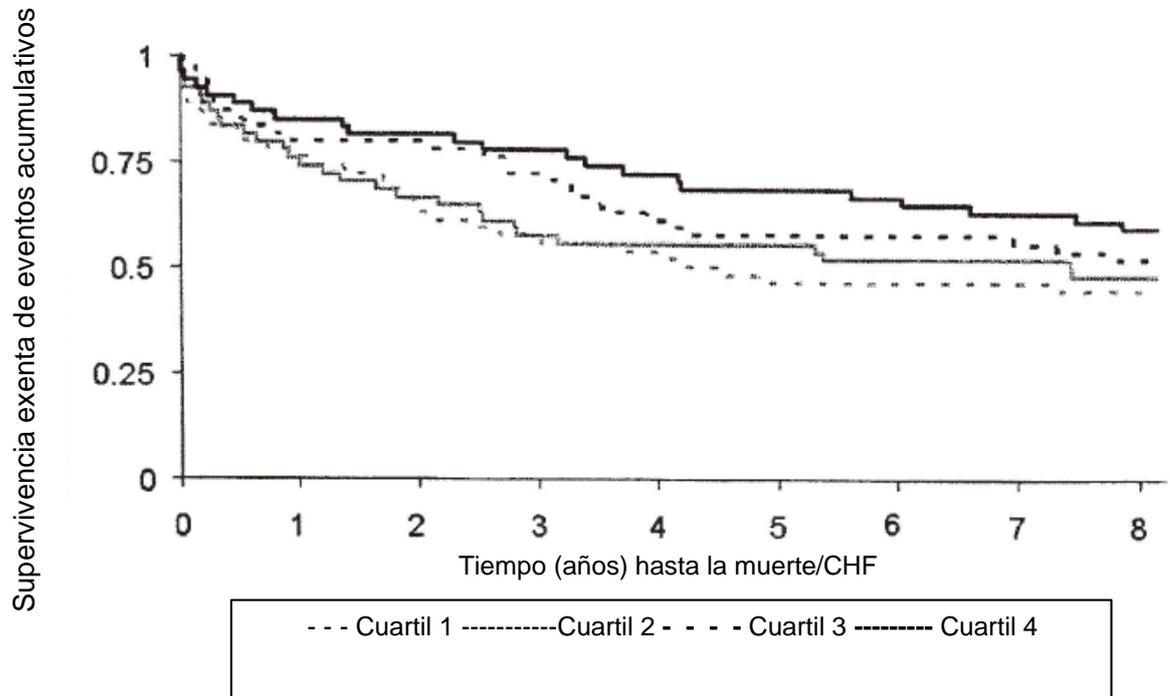


Fig. 1E

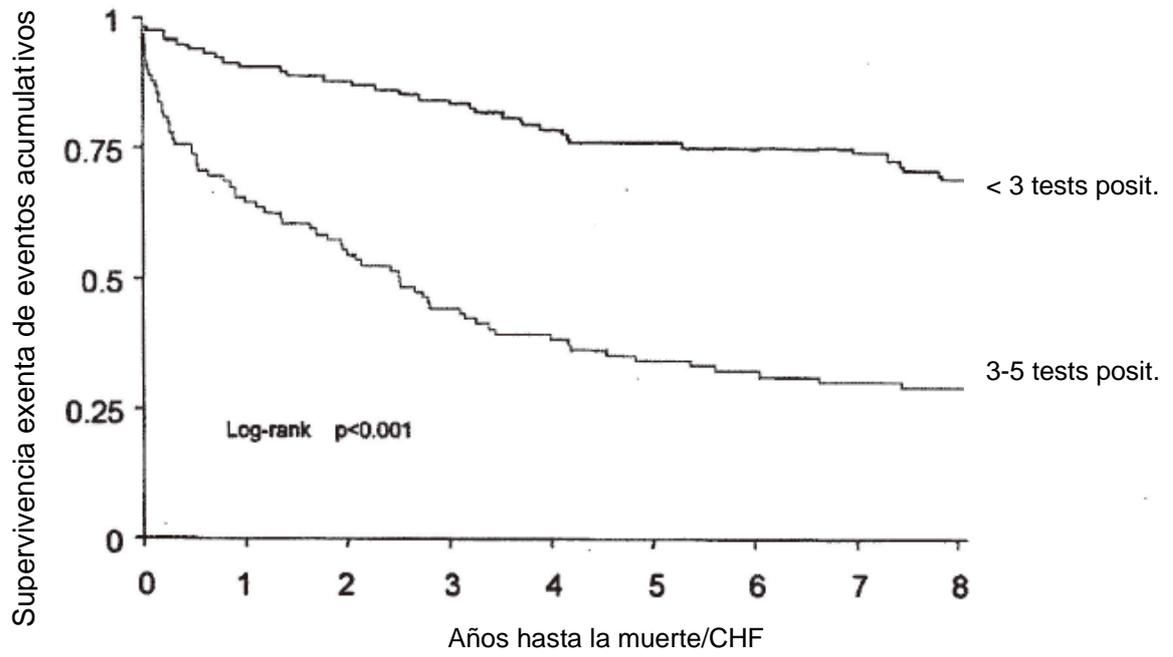


Fig. 2