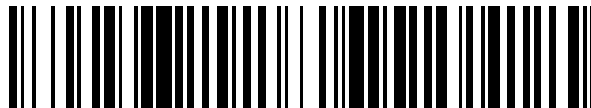


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 740**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2008 E 08716356 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2145184**

54 Título: **Utilización de SLIM-1 en la evaluación de la insuficiencia cardiaca**

30 Prioridad:

**08.03.2007 EP 07004740**

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

**30.01.2014**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH y  
THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY  
OF TORONTO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE;  
BLOCK, DIRK;  
EMILI, ANDREW;  
FONG, VINCENT;  
GRAMOLINI, ANTHONY;  
HESS, GEORG;  
HUEDIG, HENDRIK;  
ISSERLIN, RUTH;  
KISLINGER, THOMAS;  
LIU, PETER;  
MACLENNAN, DAVID y  
VON DER ELTZ, HERBERT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 440 740 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

Utilización de SLIM-1 en la evaluación de la insuficiencia cardiaca

5 Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un método para evaluar la insuficiencia cardiaca en un individuo, que comprende las etapas de medir en una muestra obtenida del individuo la concentración de proteína del marcador SLIM-1 y evaluar la insuficiencia cardiaca mediante la comparación entre la concentración determinada en la etapa (a) y la concentración de dicho marcador establecida en una muestra de control. También se da a conocer la utilización de SLIM-1 como proteína marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardiaca y una combinación de marcadores que comprende SLIM-1.

15 Antecedentes de la invención

15 La insuficiencia cardiaca (IC) es importante problema de salud pública que está creciendo. En los Estados Unidos, por ejemplo, aproximadamente 5 millones de pacientes presenta IC y cada año se diagnostican más de 550.000 pacientes con IC por primera vez (en: American Heart Association, Heart Disease and Stroke Statistics: 2005 Update, Dallas, Texas; American Heart Association, 2005). De manera similar, las estadísticas de EEUU demuestran que la IC es el motivo principal de 12 a 15 millones de visitas clínicas y 6,5 millones de días de estancia hospitalaria cada año. Entre 1990 y 1999, se ha incrementado el número anual de hospitalizaciones desde aproximadamente 810.000 a más de 1 millón por IC como diagnóstico primario y de 2,4 a 3,6 millones por IC como diagnóstico primario o secundario. En 2001, prácticamente 53.000 pacientes murieron de IC como causa principal. La insuficiencia cardiaca es principalmente una condición que afecta a personas de edad avanzada por lo que el ampliamente reconocido "envejecimiento de la población" también contribuye a la creciente incidencia de IC. La incidencia de IC se aproxima a 10 por cada 1.000 en la población de más de 65 años. Sólo en los EEUU, en 2005 se estimaron costes directos e indirectos totales de la IC de aproximadamente 27.900 millones de dólares y anualmente se dedican aproximadamente 2.900 millones de dólares a fármacos para el tratamiento de la IC (ver las estadísticas de la AHA anteriormente citadas).

## 30 Insuficiencia cardiaca

35 La insuficiencia cardiaca se caracteriza por una pérdida de la capacidad del corazón de bombear la cantidad de sangre que requiere el cuerpo. La insuficiencia no significa que el corazón ha dejado de bombear, sino que ya no bombea sangre tan eficazmente como debería.

40 La NYHA [New York Heart Association] y la ACC/AHA [American Association of Cardiology/American Heart Association] han establecido clases funcionales de IC para evaluar el avance de la enfermedad. El esquema de clasificación de la NYHA presenta cuatro clases de estado de enfermedad: la clase 1 es asintomática a cualquier nivel de esfuerzo. La clase 2 es sintomática bajo esfuerzos fuertes y las clases III y IV son sintomáticas bajo esfuerzos ligeros y ningún esfuerzo, respectivamente.

45 En el esquema de ACC/AHA en cuatro estadios, el estadio A es asintomático pero en riesgo de desarrollar IC. En el estadio B existen pruebas de disfunción cardiaca aunque sin síntomas. En el estadio C existe evidencia de disfunción cardiaca sin síntomas. En el estadio D el sujeto presenta síntomas de IC a pesar de la terapia máxima.

## Etiología de la IC

50 Médicamente, la insuficiencia cardiaca (IC) debe considerarse una enfermedad compleja. Puede estar causada por la aparición de un suceso desencadenante, tal como un infarto de miocardio (ataque al corazón) o ser secundaria a otras causas, tales como hipertensión, diabetes o malformaciones cardiacas tales como una enfermedad valvular. El infarto de miocardio u otras causas de IC resultan en un declive inicial de la capacidad de bombeo del corazón, por ejemplo al dañar el músculo cardiaco. Este declive de la capacidad de bombeo puede no ser inmediatamente notable, debido a la activación de uno o más mecanismos de compensación. Sin embargo, se ha encontrado que el avance de la IC es independiente del estado hemodinámico del paciente. Por lo tanto, los cambios dañinos causados por la enfermedad se encuentran presentes y son continuos aunque el paciente siga siendo asintomático. De hecho, los mecanismos compensadores que mantienen la función cardiovascular normal durante las etapas tempranas de la IC de hecho pueden contribuir al avance de la enfermedad a largo plazo, por ejemplo al ejercer efectos negativos sobre el corazón y su capacidad de mantener un nivel suficiente de flujo sanguíneo en la circulación.

60 Algunos de los cambios fisiopatológicos más importantes que se producen en la IC son: (i) activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, (ii) disfunción endotelial sistémica, e (iii) remodelado miocárdico.

(i) Entre las terapias dirigidas específicamente a contrarrestar la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal se incluyen los agentes bloqueantes beta-adrenérgicos (B-bloqueantes), inhibidores del enzima conversor de la angiotensina (ECA), determinados bloqueantes de los canales del calcio, nitratos y agentes bloqueantes de la endotelina-1. Los bloqueantes de los canales del calcio y los nitratos, aunque producen una mejora clínica, no se ha demostrado claramente que prolonguen la supervivencia, mientras que los B-bloqueantes y los inhibidores de la ECA se ha demostrado que prolongan significativamente la vida, al igual que los antagonistas de aldosterona. Los estudios experimentales con agentes bloqueantes de la endotelina-1 han demostrado presentar un efecto beneficioso.

(ii) La disfunción endotelial sistémica es una característica bien aceptada de la IC y se encuentra claramente presente para cuando aparecen los signos de disfunción ventricular izquierda. La disfunción endotelial es importante con respecto a la íntima relación entre la microcirculación miocárdica y los miocitos cardiacos. La evidencia sugiere que la disfunción microvascular contribuye significativamente a la disfunción de los miocitos y a los cambios morfológicos que conducen a una progresiva insuficiencia miocárdica.

En términos de la fisiopatología subyacente, la evidencia sugiere que la disfunción endotelial podría estar causada por una relativa falta de NO, lo que puede atribuirse a un incremento en la formación de  $O_2$  vascular por una oxidasa dependiente de NADH y el posterior secuestro en exceso de NO. Entre los potenciales factores contributivos de una producción incrementada de  $O_2$  se incluyen un tono simpático incrementado, norepinefrina, angiotensina-II, endotelina-I y TNF- $\alpha$ . Además, los niveles de IL-10, una citoquina antiinflamatoria clave, son inapropiadamente bajos en relación a los niveles de TNF- $\alpha$ . Ahora se cree que los niveles elevados de TNF- $\alpha$ , con citoquinas proinflamatorias asociadas, incluyendo IL-6, y receptores de TNF- $\alpha$  solubles, desempeñan un papel significativo en la evolución de la IF al causar una menor contractilidad miocárdica, dilatación biventricular e hipotensión y probablemente participan en la activación y disfunción endoteliales. También se cree que TNF- $\alpha$  desempeña un papel en la anteriormente inexplicada atrofia muscular que se produce en los pacientes con IF severa. Los estudios preliminares con un número reducido de pacientes con terapia de receptor de TNF soluble han indicado mejoras en la clasificación funcional de la NYHA y del bienestar del paciente, medidos mediante índices de calidad de vida.

(iii) El remodelado miocárdico es un proceso complejo que acompaña a la transición de insuficiencia cardiaca asintomática a sintomática, y puede describirse como una serie de cambios adaptativos en el miocardio, tales como alteraciones de la forma, masa y volumen ventricular (Piano M.R. et al., J. Cardiovasc. Nurs. 14:1-23, 2000, quiz 119-120; Molkentin J.D., Ann. Rev. Physiol. 63:391-426, 2001). Los componentes principales del remodelado miocárdico son alteraciones de la biología de los miocitos, tales como la hipertrofia de los miocitos, la pérdida de miocitos por necrosis o apoptosis, las alteraciones en la matriz extracelular y las alteraciones en la geometría de la cámara ventricular izquierda. No está claro si el remodelado miocárdico es simplemente la respuesta orgánica final que se produce tras años de exposición a los efectos tóxicos de la estimulación neurohormonal a largo plazo o si el remodelado miocárdico contribuye independientemente al avance de la insuficiencia cardiaca. Los datos hasta el momento sugieren que una terapia apropiada puede enlentecer o detener el avance del remodelado miocárdico.

#### Marcadores y estado de enfermedad

Tal como se ha indicado anteriormente, la hipertrofia de los miocitos probablemente representa una de las primeras etapas hacia la IC. La hipertrofia de los miocitos se caracteriza por una expresión incrementada de algunos genes codificantes de proteínas contráctiles, tales como la cadena pesada de la p-miosina y la troponina T (TnT) y de algunas proteínas no contráctiles, tales como los péptidos natriuréticos de tipo A y de tipo B, por un tamaño celular incrementado y por la alteración del citoesqueleto (Piano M.R. et al., J. Cardiovasc. Nurs. 14:1-23, 2000, quiz 119-120; Molkentin J.D., Ann. Rev. Physiol. 63:391-426, 2001).

Los estudios de modelos humanos y animales de insuficiencia cardiaca sugieren una función deprimida de los miocitos en los últimos estadios de la insuficiencia cardiaca. Se ha sugerido que los mecanismos subyacentes a la disfunción de los miocitos implican alteraciones en la red de manipulación del calcio, los miofilamentos y el citoesqueleto (de Tombe P.P., Cardiovasc. Res. 37:367-380, 1998). Por ejemplo, en modelos humanos y animales de insuficiencia cardiaca, la actividad enzimática de la calcio-ATPasa del retículo sarcoplásmico se encuentra reducida, mientras que los niveles tanto de ARNm como de proteínas del intercambiador sarcolémico de  $Na^+/Ca^{2+}$  se encuentran incrementados. Además, se produce cambio de isoforma de TnT, una fosforilación reducida de la troponina I (TnI), una menor actividad de actomiosina-ATPasa miofibrilar y una formación incrementada de microtúbulos en modelos tanto humanos como animales de insuficiencia cardiaca.

Inicialmente, los cambios en el corazón que conducen al remodelado miocárdico pretenden compensar las partes enfermas del miocardio con el fin de soportar la demanda corporal de oxígeno y nutrientes. Sin embargo, la etapa compensatoria de la insuficiencia cardiaca es limitada y finalmente el corazón insuficiente no es capaz de mantener

la salida cardiaca adecuada para satisfacer las necesidades del cuerpo. De esta manera, se produce una transición entre una etapa compensatoria y una etapa descompensatoria. En la etapa descompensatoria, continúa la cascada de cambios en el corazón pero ya no resulta beneficiosa, llevando al paciente al avance de la insuficiencia cardiaca a un estado crónico y finalmente a la muerte.

5 Según la "ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult" [Actualización de las directrices 2005 de ACC/AHA para el diagnóstico y control de la insuficiencia cardiaca crónica en el adulto] (S. Hunt et al., www.acc.org = las directrices prácticas de ACC/AHA) el continuo de la enfermedad en el área de la insuficiencia cardiaca actualmente se agrupa en cuatro estadios, tal como se ha indicado anteriormente.  
10 En los estadios A y B se encuentran los individuos en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca, mientras que los estadios C y D representan los grupos de pacientes que muestran signos y síntomas de insuficiencia cardiaca. Los detalles para definir los diferentes estadios A a D tal como se proporcionan en la referencia anteriormente indicada se incluyen en la presente memoria como referencia.

#### 15 Métodos diagnósticos en la insuficiencia cardiaca

El ensayo diagnóstico más útil en la evaluación de los pacientes con IC es el ecocardiograma bidimensional integral conjuntamente con estudios de flujo Doppler para determinar la presencia de las anomalías del miocardio, válvulas cardíacas o pericardio y las cámaras afectadas. Deben tratarse tres preguntas fundamentales: 1) el FEVI se conserva o está reducido, 2) la estructura del VI es normal o anormal, y 3) ¿existen otras anomalías estructurales, tales como anomalías valvulares, pericárdicas o del ventrículo derecho que puedan explicar la presentación clínica? Debe cuantificarse esta información con una estimación numérica de la FE, la medición de las dimensiones y/o volúmenes ventriculares, la medición del grosor de las paredes y la evaluación de la geometría de las cámaras y del movimiento de la pared regional. Debe evaluarse el tamaño del ventrículo izquierdo y el rendimiento sistólico. También debería determinarse semicuantitativamente el tamaño auricular y medirse las dimensiones y/o volúmenes de la aurícula izquierda.

Los datos hemodinámicos no invasivos obtenidos en el momento de la ecocardiografía son una variable adicional importante para pacientes con FE conservada o reducida. La cuantificación combinada del patrón de flujo de entrada por la válvula mitral, patrón de flujo de entrada venoso pulmonar y velocidad anular mitral proporciona datos sobre las características del llenado del VI y la presión auricular izquierda. La evaluación del gradiente de regurgitación de la válvula tricúspide junto con la medición de las dimensiones de la vena cava inferior y su respuesta durante la respiración proporcionan una estimación de la presión arterial pulmonar sistólica y de la presión venosa central.

35 El volumen de bombeo puede determinarse con una medición combinada de las dimensiones y Doppler pulsado en el tracto de flujo de salida del VI. Sin embargo, pueden encontrarse presentes anomalías en cualquiera de dichos parámetros en ausencia de IC. Ninguna de ellas se correlaciona necesariamente de manera específica con la IC; sin embargo, un patrón de llenado totalmente normal es un argumento contra el diagnóstico de IC clínica.

40 Desde una perspectiva clínica, la enfermedad es clínicamente asintomática en las etapas compensatoria y descompensatoria temprana (completamente asintomática en el estadio A y con enfermedad cardiaca estructural pero sin signos ni síntomas de IC en el estadio B, ver las directrices prácticas de ACC/AHA). Los signos manifiestos de la enfermedad (tales como la falta de aliento) no aparecen hasta bien entrada la etapa descompensatoria (es decir, los estadios C y D según las directrices de ACC/AHA). El diagnóstico actualmente se basa en los síntomas exteriores de los pacientes en los estadios C y D.

Típicamente, los pacientes con insuficiencia cardiaca reciben un tratamiento estándar con fármacos que interactúan con mecanismos específicos que intervienen en la insuficiencia cardiaca. No existen ensayos diagnósticos que reflejen dichos mecanismos específicos de manera fiable y ayuden al médico a seleccionar el fármaco correcto (y la dosis correcta) para cada paciente (por ejemplo un inhibidor de la ECA, AT II,  $\beta$ -bloqueantes, etc.).

#### Diagnóstico previo de la IC con marcadores

55 La evaluación precoz de los pacientes en riesgo de insuficiencia cardiaca aparentemente sólo resulta posible con marcadores bioquímicos, ya que el individuo en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca en ese estadio todavía no presenta síntomas clínicos de IC. No existen marcadores bioquímicos establecidos disponibles actualmente para la evaluación presintomática fiable de la enfermedad. Actualmente, una vez se ha establecido el diagnóstico de IC, la enfermedad ya se encuentra muy avanzada.

60 La familia del péptido natriurético, especialmente la familia del péptido natriurético auricular y la familia del péptido natriurético cerebral en los últimos años han demostrado ser de valor significativo en la evaluación de la IC.

#### Pronóstico de la IC y necesidades

Debido por lo menos en parte al diagnóstico tardío, el 50% de los pacientes con IC mueren dentro de los dos años posteriores al diagnóstico. La tasa de supervivencia a 5 años es inferior al 30%. Existe una necesidad significativa de nuevos marcadores bioquímicos que ayuden al diagnóstico precoz de la insuficiencia cardiaca.

5 Se justifica una mejora de la evaluación precoz de los individuos en riesgo de insuficiencia cardiaca, es decir, de los individuos que son clínicamente asintomáticos de insuficiencia cardiaca.

10 En los últimos años se ha establecido que los marcadores de péptido natriurético de tipo B representan una herramienta excelente para monitorizar la progresión de la enfermedad en pacientes con IC y para evaluar su riesgo de complicaciones cardiovasculares tales como el ataque al corazón.

Sin embargo, al igual que en muchas otras áreas diagnósticas, no resulta suficiente un único marcador.

15 Mientras que un valor bajo de NT-proBNP presenta un valor predictivo negativo muy elevado para descartar la IC o la EVI, el valor predictivo positivo de insuficiencia cardiaca en el estudio anteriormente indicado y en otros estudios (ver Triepels R.H. et al., Clin. Chem. 49, supl.:A37-38, 2003) se ha encontrado que es de entre 50% y 60%. De esta manera, un marcador útil para evaluar los individuos en riesgo de insuficiencia cardiaca que por sí solo, por ejemplo, o en combinación con NT-proBNP, presente un valor predictivo positivo elevado, y en comparación con NT-proBNP solo, resulta de elevada importancia clínica/práctica.

20 Un marcador que ayude a evaluar un paciente con insuficiencia cardiaca también resulta de importancia elevada para conseguir un avance técnico adicional en este área diagnóstica clínicamente tan importante y exigente.

#### 25 Descripción resumida de la invención

Ahora se ha encontrado y establecido que el marcador SLIM-1 puede ayudar a evaluar la insuficiencia cardiaca. En una realización puede ayudar a evaluar si un individuo presenta riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca. En un aspecto adicional puede ayudar a evaluar el avance de la enfermedad. En otra realización puede ayudar a predecir la aparición de la insuficiencia cardiaca. En otra realización puede ayudar a evaluar y seleccionar un régimen de tratamiento apropiado para prevenir o tratar la insuficiencia cardiaca.

30 En la presente memoria se da a conocer un método para evaluar la insuficiencia cardiaca en un individuo, que comprende las etapas de medir en una muestra obtenida del individuo la concentración de proteína del marcador SLIM-1 y b) evaluar la insuficiencia cardiaca mediante la comparación entre la concentración determinada en la etapa (a) y la concentración de dicho marcador establecida en una muestra de control, en la que un nivel incrementado de SLIM-1 es indicativo de insuficiencia cardiaca.

35 La invención se refiere además a la utilización in vitro de la proteína SLIM-1 como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardiaca.

Se da a conocer además la utilización in vitro de una combinación de marcadores que comprende SLIM-1 y otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca en la evaluación de la insuficiencia cardiaca.

40 Algunos aspectos y ventajas adicionales de la presente invención resultarán evidentes en vista de la descripción a continuación.

#### 45 Descripción detallada de la invención

50 En una primera realización la presente invención se refiere a un método para evaluar la insuficiencia cardiaca en un individuo, que comprende las etapas de a) medir en una muestra obtenida del individuo la concentración de proteína del marcador SLIM-1 y b) evaluar la insuficiencia cardiaca mediante la comparación entre la concentración determinada en la etapa (a) y la concentración de dicho marcador establecida en una muestra de control, en la que un nivel incrementado de SLIM-1 es indicativo de insuficiencia cardiaca.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, cada una de las expresiones siguientes presenta el significado asociado a las mismas en la presente sección.

60 Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (es decir a por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A título de ejemplo, "un anticuerpo" se refiere a un anticuerpo o a más de un anticuerpo.

La expresión "uno o más" se refiere a 1 a 50, preferentemente 1 a 20, también preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 12 ó 15.

El término "marcador" o "marcador bioquímico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula que debe utilizarse como diana para el análisis de una muestra de ensayo de un paciente. En una realización, son ejemplos de dichas dianas moleculares, proteínas o polipéptidos. Entre las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención se contempla que se incluyen los fragmentos naturales de dichas proteínas, en particular los fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables preferentemente comprenden por lo menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador.

El experto en la materia reconocerá que las proteínas que son liberadas por las células o que se encuentran presentes en la matriz extracelular pueden resultar dañadas, por ejemplo durante la inflamación, y podrían resultar degradadas o cortadas en dichos fragmentos. Se sintetizan determinados marcadores en una forma inactiva, que posteriormente pueden activarse mediante proteólisis. Tal como apreciará el experto en la materia, las proteínas o fragmentos de las mismas también pueden encontrarse presentes como parte de un complejo. Dicho complejo también puede utilizarse como marcador en el sentido de la presente invención. Además, o alternativamente, un polipéptido marcador puede portar una modificación post-traducciona. Son ejemplos de modificaciones post-traduccionales, entre otras, la glucosilación, la acilación y/o la fosforilación.

La expresión "evaluación de la insuficiencia cardiaca" se utiliza para indicar que el método según la presente invención ayuda al médico a evaluar si un individuo presenta riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca, o ayuda al médico en la evaluación de un paciente de IC en otra u otras áreas de relevancia diagnóstica en la IC. Son áreas preferentes de relevancia diagnóstica en la evaluación de un individuo con IC, la estadificación de la insuficiencia cardiaca, el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardiaca aguda y crónica, la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad, las guías para seleccionar un fármaco apropiado, el seguimiento de la respuesta a la terapia y el seguimiento de los pacientes de IC.

Un "marcador de insuficiencia cardiaca" en el sentido de la presente invención es cualquier marcador que, en combinación con el marcador SLIM-1, añade información relevante para la evaluación de la IC a la pregunta diagnóstica investigada. La información se considera relevante o de valor aditivo en el caso de que, a una especificidad dada, la sensibilidad, o en el caso de que a una sensibilidad dada la especificidad, respectivamente, de la evaluación de la IC pueda mejorarse mediante la inclusión de dicho marcador en una combinación de marcadores que ya comprende el marcador SLIM-1. Preferentemente, la mejora de la sensibilidad o especificidad, respectivamente, resulta estadísticamente significativa a un nivel de significancia de  $p=0,05$ ,  $0,02$ ,  $0,01$  ó inferior. Preferentemente, el otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca se seleccionan de entre el grupo que consiste de un marcador péptido natriurético, un marcador de troponina cardiaca y un marcador de inflamación.

El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra biológica obtenida con el propósito de la evaluación in vitro. En los métodos de la presente invención, la muestra o muestra del paciente preferentemente puede comprender cualquier líquido corporal. Entre las muestras de ensayo preferentes se incluyen sangre, suero, plasma, orina, saliva y líquido sinovial. Las muestras preferentes son sangre completa, suero, plasma o líquido sinovial, representando el plasma o el suero el tipo más conveniente de muestra. Tal como apreciará el experto en la materia, cualquiera de dichas evaluaciones se realiza in vitro. Posteriormente se desecha la muestra del paciente. La muestra del paciente se utiliza exclusivamente para el método in vitro de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere de vuelta al cuerpo del paciente. Típicamente la muestra es una muestra líquida, por ejemplo sangre completa, suero o plasma.

La expresión "comparando la concentración ... con la concentración establecida en una muestra de control" se utiliza meramente para ilustrar adicionalmente lo que resulta evidente de todas maneras para el experto en la materia. La muestra de control puede ser una muestra de control interno o externo. En una realización se utiliza una muestra de control interno, es decir, el nivel o niveles del marcador se evalúan en la muestra de ensayo, así como en otra u otras muestras obtenidas del mismo sujeto para determinar si se han producido cambios en el nivel o niveles de dicho marcador o marcadores. En otra realización se utiliza una muestra de control externo. Para una muestra de control externo se compara la presencia o cantidad de un marcador en una muestra derivada del individuo con su presencia o cantidad en un individuo que es conocido que sufre, o es conocido que presenta riesgo de sufrir, una condición dada, o en un individuo que es conocido que se encuentra libre de una condición dada, es decir, un "individuo normal". Por ejemplo, puede compararse un nivel de marcador en una muestra de un paciente con un nivel que es conocido que se asocia a un curso específico de enfermedad en la IC. Habitualmente el nivel de marcador de la muestra se correlaciona directa o indirectamente con un diagnóstico y el nivel del marcador se utiliza, por ejemplo, para determinar si el individuo presenta riesgo de IC. Alternativamente, el nivel de marcador de la muestra puede compararse, por ejemplo, con un nivel de marcador que es conocido que se asocia a una respuesta a la terapia en pacientes de IC, utilizarse en el diagnóstico diferencial de insuficiencia cardiaca aguda y crónica, como guía para seleccionar un fármaco apropiado para el tratamiento de la IC, en la evaluación del riesgo de

5 progresión de la enfermedad o en el seguimiento de los pacientes de IC. Según el uso diagnóstico pretendido, se selecciona una muestra de control apropiada y un valor de control o de referencia para el marcador establecido en la misma. El experto en la materia apreciará que dicha muestra de control en una realización se obtiene de una población de referencia de edad correspondiente y sin enfermedades de confusión. Tal como también resultará  
 10 evidente para el experto en la materia, los valores absolutos de los marcadores en una muestra de control dependerán del ensayo utilizado. Preferentemente se utilizan muestras de 100 individuos bien caracterizados procedentes de la población apropiada de referencia a fin de establecer un valor de control (referencia). También resulta preferente que la población de referencia se seleccione para que consista de 20, 30, 50, 200, 500 ó 1.000 individuos. Los individuos sanos representan una población preferente de referencia para establecer un valor de control. En una realización, la muestra de control será una muestra de control interno. En la presente realización, se obtienen muestras en serie del individuo investigado y se comparan los niveles de marcador.

15 Un valor incrementado de SLIM-1 medido de una muestra derivada de un individuo es indicativo de insuficiencia cardíaca.

Los valores de SLIM-1 medidos en un grupo de control o en una población de control se utilizan, por ejemplo, para establecer un valor de corte o un intervalo de referencia. Un valor superior a dicho valor de corte o fuera del intervalo de referencia y su extremo superior se considera elevado.

20 En una realización se establece un valor de corte prefijado. Dicho valor de corte se selecciona para que se corresponda con la pregunta diagnóstica de interés.

25 En una realización, los valores de SLIM-1 medidos en un grupo de control o en una población de control se utilizan para establecer un intervalo de referencia. En una realización preferente, una concentración de SLIM-1 se considera elevada en el caso de que el valor medido sea superior al percentil 90 del intervalo de referencia. En realizaciones preferentes adicionales, una concentración de SLIM-1 se considera elevada en el caso de que el valor medido sea superior al percentil 95, al percentil 96, al percentil 97 ó al percentil 97,5 del intervalo de referencia.

30 En una realización, la muestra de control será una muestra de control interno. En la presente realización, se obtienen muestras en serie del individuo investigado y se comparan los niveles de marcador. Lo anterior puede resultar útil, por ejemplo, en la evaluación de la eficacia de la terapia.

35 El método según la presente invención se basa en una muestra líquida que se obtiene de un individuo y en la medición de SLIM-1 en dicha muestra. Un "individuo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un único organismo humano o no humano. De esta manera, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria resultan aplicables a enfermedades tanto humanas como veterinarias. Preferentemente, el individuo es un ser humano.

40 Las proteínas SLIM, especialmente SLIM-1

Cada una de las secuencias proteicas de SLIM-1, SLIM-2 y SLIM-3 contiene 4 dominios LIM y la segunda mitad de un quinto dominio LIM (FHL, cuatro proteínas LIM y media). SLIM-1 presenta un peso molecular de 36 kD y consiste de 280 aminoácidos (ver SEC ID nº 1).

45 Originalmente, la familia de proteínas LIM se denominó por las iniciales de los tres factores de transcripción identificados en los que se había observado por primera vez la secuencia LIM: lin-11 (Freyd G., et al., Nature 344:876-879, 1990), isle (Karlsson O., et al., Nature 344:879-882, 1990) y mec-3 (Way J.C. y Chalfie M., Cell 54:5-16, 1988) . Las proteínas LIM participan en un amplio abanico de funciones celulares tales como la transcripción, la transformación oncogénica, la transducción de señales y en la adhesión celular. Lo anterior puede conseguirse mediante interacciones proteína-proteína, ya que el dominio LIM contiene estructuras de dedo de cinc. Los dominios LIM pueden asociarse con otros dominios LIM, formando de esta manera homodímeros y heterodímeros (Feuerstein R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10655-10659, 1994).

55 Se ha informado de que SLIM-1/FHL-1 se localiza en adhesiones focales en mioblastos esqueléticos, en donde estimula extensión y migración celulares dependientes de la integrina (Robinson et al., Am. J. Physiol. 284:C681, 2003). Recientemente, la hibridación de dos híbridos en una levadura de una biblioteca de músculo esquelético humano ha identificado la proteína C de unión a miosina (MyBP-C) como pareja de unión de FHL-1 y se ha planteado la hipótesis de que FHL-1 presenta una función como regulador de la actividad de MyBP-C y en el ensamblaje de los sarcómeros (McGrath M.J. et al., J. Biol. Chem. 281:7666-7683, 2006). El patrón de expresión de FHL-1 sugiere una función importante de FHL-1 en el corazón durante el desarrollo embrionario (Chu P.H. et al., Mech. Dev. 95:259-265, 2000), así como durante periodos del crecimientos postnatal de los músculos esqueléticos.

60 Se ha observado que los niveles de ARNm de FHL-1 se incrementan durante la hipertrofia del músculo esquelético,

inducida por el estiramiento (Morgan M.J. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212:840-846, 1995). Los niveles de ARNm de FHL-1 caen durante la atrofia inducida por denervación (Loughna P.T. et al., *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3:136-140, 2000).

5 Algunos estudios discordantes informan de la regulación positiva o negativa del ARNm de SLIM-1 en corazones insuficientes humanos. Se ha informado de una expresión de ARNm de FHL-1 incrementada en corazones humanos hipertrofiados (Hwang D.M. et al., *Circulation* 96:4146-4203, 1997; Hwang D.M. et al., *Genomics* 66:1-14, 2000; Lim D.-S. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 38:1175-1180, 2001). En contraste, Loughna P.T. et al., *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3:136-140, 2000, y Zimmermann R. et al., *Circulation* 100, supl. 1:565, 1999, informan de una reducción de la expresión de FHL-1. Yang J. et al. (*Circulation* 102:3046-3052, 2000) informan de que en tejido derivado tanto del corazón insuficiente humano se reducen los niveles tanto de ARNm de SLIM-1 como de proteína SLIM-1.

10 El documento US nº 2006/0094038 describe la expresión génica diferencial de numerosos genes, comprendiendo FHL-1 (regulación positiva) y FHL-2 (regulación negativa) en el contexto del diagnóstico de la susceptibilidad de un individuo a la insuficiencia cardíaca.

15 Además, se ha descrito la expresión diferencial de ARNm de FHL-1 en estudios de micromatrices en poblaciones de células madre de piel, neurales, hematopoyéticas y embrionarias, sugiriendo un papel más generalizado de FHL-1 en diversas poblaciones de células madre y progenitoras (Ramalho-Santos M. et al., *Science* 298:597-600, 2002; Tumber T. et al., *Science* 303:359-363, 2004).

20 Además, varias solicitudes de patente se refieren al diagnóstico tumoral mediante el análisis de la expresión diferencial de FHL-1. El documento US nº 2005/0037389 da a conocer que numerosos genes, uno de los cuales es FHL-1, pueden utilizarse para el diagnóstico de carcinomas papilares serosos uterinos y tumores papilares serosos ováricos. El documento US nº 2005/0048535 se refiere a una lista de genes candidatos que incluye FHL-1 asociado a tumores papilares serosos ováricos primarios. El documento US nº 2004/0029151 describe el perfilado genético del cáncer de próstata y entre otros genes expresados diferencialmente menciona SLIM-1. El documento WO nº 2006/112867 se refiere al diagnóstico de la agresividad del carcinoma papilar de células renales mediante el perfilado genético y entre otros muchos genes expresados diferencialmente menciona SLIM-1.

25 El documento WO nº 2004/092410 describe la expresión diferencial de SLIM-1 en el contexto de la artritis reumatoide o la osteoartritis, respectivamente.

30 La esclerosis múltiple es todavía otra enfermedad más para la que se informa de una asociación (regulación positiva) con la expresión del gen FHL-1 (documentos US nº 2004/0018522 y nº 2004/0156826).

35 De esta manera, aparentemente en la técnica se ha estudiado extensivamente la expresión génica de SLIM-1 mediante el análisis de los niveles correspondientes de ARNm. Estos estudios no han conducido a una imagen clara debido a que los resultados publicados son contradictorios. Apparentemente tampoco se han publicado datos del nivel circulante de la proteína SLIM-1 en relación a la insuficiencia cardíaca.

40 Preferentemente el marcador SLIM-1 se mide específicamente de una muestra líquida mediante la utilización de un agente de unión específica.

45 Un agente de unión específica es, por ejemplo, un receptor de SLIM-1, una lectina de unión a SLIM-1 ó un anticuerpo de SLIM-1. Un agente de unión específica presenta una afinidad de por lo menos  $10^7$  l/mol para su molécula diana correspondiente. El agente de unión específica preferentemente presenta una afinidad de  $10^8$  l/mol o incluso más preferentemente de  $10^9$  l/mol para su molécula diana. Tal como apreciará el experto en la materia, el término específico se utiliza para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específica de SLIM-1. Preferentemente, el nivel de unión a una biomolécula diferente de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que es de tan sólo 10% o inferior, más preferentemente de tan sólo 5% o inferior a la afinidad de la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específica preferente satisface los criterios mínimos anteriormente indicados tanto de afinidad como de especificidad.

50 Un agente de unión específica preferentemente es un anticuerpo que es reactivo con SLIM-1. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, a un anticuerpo monoclonal, a fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos, a anticuerpos de cadena sencilla, así como a constructos genéticos que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

55 Puede utilizarse cualquier fragmento de anticuerpo que siga cumpliendo los criterios anteriormente indicados para un agente de unión específica. Los anticuerpos se generan mediante procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo tal como los descritos en Tijssen (Tijssen P., *Practice and theory of enzyme immunoassays*, Elsevier



Science Publishers B.V., Amsterdam (1990), la obra completa, especialmente las páginas 43 a 78). Además, el experto en la materia conoce perfectamente los métodos basados en inmunosorbentes que pueden utilizarse para el aislamiento específico de anticuerpos. Por estos medios puede mejorarse la calidad de los anticuerpos policlonales y por lo tanto su rendimiento en los inmunoensayos (Tijssen P., supra, páginas 108 a 115).

5 Para los resultados dados a conocer en la presente invención pueden utilizarse anticuerpos policlonales generados en conejos. Sin embargo, claramente también pueden utilizarse anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo ratas, cabras o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Debido a que los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cualquier cantidad requerida con propiedades constantes, representan herramientas ideales para el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica. La generación y la utilización de anticuerpos monoclonales de SLIM-1 en un método según la presente invención representan todavía otras realizaciones preferentes.

10 Tal como apreciará el experto en la materia, SLIM-1 ha sido identificado como un marcador que resulta útil en la evaluación de la IC; pueden utilizarse maneras alternativas para alcanzar un resultado comparable a los resultados de la presente invención. Por ejemplo, pueden utilizarse estrategias alternativas para generar anticuerpos. Dichas estrategias comprenden, entre otros, la utilización de péptidos sintéticos o recombinantes que representen un epítipo clínicamente relevante de SLIM-1 para la inmunización. Alternativamente, puede utilizarse la inmunización con ADN, también conocida como vacunación de ADN.

15 Para la medición, la muestra líquida obtenida de un individuo se incuba con el agente de unión específica de SLIM-1 bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo de agente de unión-SLIM-1. No resulta necesario especificar dichas condiciones, ya que el experto en la materia podrá identificar fácilmente dichas condiciones apropiadas de incubación sin ningún esfuerzo inventivo. Se mide la cantidad de complejo de agente de unión-SLIM-1 y se utiliza en la evaluación de la IC. Tal como apreciará el experto en la materia, existen numerosos métodos para medir la cantidad de complejo de agente de unión específica-SLIM-1, la totalidad de los cuales se describe en detalle en libros de texto relevantes (ver, por ejemplo, Tijssen P., supra, o Diamandis E.P. y Christopoulos T.K. (editores), Immunoassay, Academic Press, Boston, 1996).

20 Preferentemente, SLIM-1 se detecta en un formato de ensayo de tipo sándwich. En dicho ensayo, se utiliza un primer agente de unión específica para capturar SLIM-1 en un lado y un segundo agente de unión específica, que se marca para que resulte detectable directa o indirectamente, se utiliza en el otro lado. Preferentemente, se utiliza un anticuerpo de SLIM-1 en un inmunoensayo cualitativo (presencia o ausencia de SLIM-1) o cuantitativo (se determina la cantidad de SLIM-1).

25 Tal como se describe en detalle en la sección de Ejemplos, se han utilizado dos modelos de ratón para identificar los polipéptidos observados en tejido cardíaco en animales experimentales mediante métodos de proteómica avanzada. Sin embargo, dichos modelos han proporcionado datos por lo menos parcialmente conflictivos y, evidentemente, los datos de tejidos para los polipéptidos no son representativos de la presencia o ausencia de estos polipéptidos en la circulación. Un marcador que se haya observado que se expresa diferencialmente en un modelo puede no expresarse diferencialmente en un segundo modelo o incluso mostrar datos conflictivos en todavía otro modelo. Aunque una proteína se exprese diferencialmente en tejido, esta proteína en la mayoría de casos no presenta ninguna relevancia diagnóstica en el caso de que se mida de un líquido corporal porque podría no ser liberada a la circulación, podría fragmentarse o resultar modificada, por ejemplo al liberarse a partir de una célula o tejido, podría no ser estable en la circulación, podría no ser medible en la circulación, no ser específica para una enfermedad dada, etc.

30 Los inventores de la presente invención inesperadamente han podido detectar la proteína SLIM-1 en una muestra de líquido corporal. Todavía más inesperadamente, han podido demostrar que la presencia de SLIM-1 en dicha muestra líquida obtenida de un individuo puede correlacionarse con la IC. No se requiere ninguna muestra de tejido o de biopsia para utilizar el marcador SLIM-1 en la evaluación de la IC. La medición del nivel de la proteína SLIM-1 se considera muy ventajosa en el campo de la IC.

35 En una realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con suero como material líquido de muestra. En una realización preferente adicional, el método según la presente invención se pone en práctica con plasma como material líquido de muestra. En una realización preferente adicional, el método según la presente invención se pone en práctica con sangre completa como material líquido de muestra.

40 En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a la utilización de proteína SLIM-1 como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

45 El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un único suceso o proceso causaría la enfermedad correspondiente, tal como, por ejemplo, en enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, el

5 diagnóstico correcto puede resultar muy difícil, especialmente en el caso de que la etiología de la enfermedad no se entienda por completo, tal como es el caso de la IC. Tal como apreciará el experto en la materia, ningún marcador bioquímico en el campo de la IC es diagnóstico con una especificidad del 100% y simultáneamente con una sensibilidad del 100% para una determinada pregunta diagnóstica. Por el contrario, los marcadores bioquímicos se utilizan para evaluar con una determinada probabilidad o valor predictivo una pregunta diagnóstica subyacente. Al experto en la materia le resultarán totalmente familiares los métodos matemáticos/estadísticos que se utilizan rutinariamente para calcular un riesgo relativo o probabilidad para la pregunta diagnóstica que debe evaluarse. En la práctica clínica rutinaria de manera general el médico considera conjuntamente diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos en el diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad subyacente.

10 Preferentemente, en una realización preferente adicional de la presente invención, el método de evaluación de la IC se lleva a cabo midiendo la concentración de SLIM-1 y otro u otros marcadores y mediante la utilización de la concentración de SLIM-1 y otro u otros marcadores en la evaluación de la IC.

15 En la evaluación de la IC, el marcador SLIM-1 ayuda al médico en uno o más de los aspectos siguientes: a evaluar el riesgo de un individuo de insuficiencia cardíaca o a evaluar un paciente que presenta insuficiencia cardíaca, por ejemplo con intención de identificar el estadio de la insuficiencia cardíaca, a diferenciar entre la insuficiencia cardíaca aguda y crónica, a evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad, proporcionando una guía en la selección de una terapia apropiada, en el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia y a realizar un seguimiento del curso de la enfermedad, es decir, en el seguimiento de los pacientes de IC.

Cribado (evaluación de si los individuos presentan un riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca)

25 En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método in vitro para evaluar si un individuo presenta un riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador SLIM-1, de medir opcionalmente en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y de evaluar el riesgo de dicho individuo de desarrollar insuficiencia cardíaca mediante la comparación de la concentración de SLIM-1 y opcionalmente la concentración o concentraciones determinadas para opcionalmente otro u otros marcadores con la concentración de dicho marcador o de dichos marcadores con su valor o valores de referencia.

35 El cribado en el sentido de la presente invención se refiere a una evaluación no sesgada de los individuos con respecto a su riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Mientras que dicho cribado en teoría puede llevarse a cabo en cualquier muestra, en la práctica clínica dicha opción de cribado habitualmente se proporcionará a individuos que de alguna manera presenten un riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Tal como se ha comentado anteriormente, dichos individuos pueden ser clínicamente asintomáticos, es decir, pueden no presentar signos o síntomas de IC. En una realización preferente, el cribado para IC puede proporcionarse a individuos en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, por ejemplo en los estadios A o B según definen las directrices prácticas de ACC/AHA.

40 Tal como se ha indicado anteriormente, la insuficiencia cardíaca es una de las enfermedades más prevalentes, costosas y potencialmente letales en los países desarrollados. Debido a su elevada prevalencia y a su larga etapa asintomática, la identificación de los individuos en riesgo de desarrollar IC resultaría de la máxima importancia para intervenir en, y en caso posible interrumpir, el curso de la enfermedad. Sin una evaluación de riesgo muy precoz, la prevención de la progresión de la enfermedad desde el estado asintomático a la fase sintomática de la IC aparentemente resulta imposible.

50 El riesgo de insuficiencia cardíaca se evalúa mediante métodos matemáticos/estadísticos totalmente conocidos y entendidos por el experto en la materia. Preferentemente el riesgo de un individuo de insuficiencia cardíaca se expresa en términos relativos y se proporciona el denominado riesgo relativo (=RR). Con el fin de calcular dicho RR para la insuficiencia cardíaca, se compara el valor de SLIM-1 de un individuo con los valores establecidos para SLIM-1 en una población de referencia, preferentemente individuos sanos que no desarrollan insuficiencia cardíaca. También preferentemente la evaluación de dicho RR para la insuficiencia cardíaca se basa en un grupo de individuos que han desarrollado insuficiencia cardíaca dentro del periodo de estudio, preferentemente en un año, o también preferentemente en dos años, y un grupo de individuos que no ha desarrollado insuficiencia cardíaca en el mismo periodo de estudio.

60 En otra realización preferente, la presente invención se refiere a la utilización del marcador SLIM-1 en el cribado para la insuficiencia cardíaca. Tal como conoce el experto en la materia, la expresión "utilización como marcador" implica que la concentración de una molécula marcadora se cuantifica por medios apropiados y que ese valor medido para dicho marcador seguidamente se utiliza para indicar, es decir para marcar, la presencia o la ausencia de una enfermedad o condición clínica. Los medios apropiados para la cuantificación son, por ejemplo, agentes de unión específica, tales como anticuerpos.

5 Preferentemente, el cribado para la IC se lleva a cabo en individuos que se sospecha que presentan un riesgo de futura insuficiencia cardiaca. Los pacientes en riesgo de futura insuficiencia cardiaca en este sentido son pacientes en los que se ha diagnosticado hipertensión, enfermedad aterosclerótica, diabetes, obesidad y síndrome metabólico. Preferentemente el riesgo de futura insuficiencia cardiaca se evalúa con individuos que sufren de hipertensión, enfermedad aterosclerótica, diabetes y/o síndrome metabólico.

10 También resulta preferente la utilización del marcador SLIM-1 para la evaluación del riesgo de futura insuficiencia cardiaca de un individuo en el estadio B según las directrices prácticas de ACC/AHA, es decir, un individuo que muestra un cambio estructural del corazón pero que no muestra síntomas de insuficiencia cardiaca.

En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a la utilización de SLIM-1 como un marcador de una combinación de marcadores de IC con fines de cribado de IC.

15 En el contexto del cribado, un nivel elevado de SLIM-1 es un indicador positivo del riesgo incrementado de un individuo de desarrollar insuficiencia cardiaca.

#### Estadificación de los pacientes

20 En la presente memoria se da a conocer un método in vitro que ayuda a estadificar los pacientes de insuficiencia cardiaca, que comprende las etapas de: a) medir en una muestra la concentración del marcador SLIM-1, b) medir opcionalmente en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, y estadificar la insuficiencia cardiaca mediante la comparación de la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la concentración o concentraciones determinadas en la etapa (b) con la concentración de dicho marcador o de dichos marcadores con su valor o valores de referencia. Preferentemente el nivel del marcador SLIM-1 se utiliza como ayuda en la clasificación de los individuos investigados en los grupos de individuos que son clínicamente "normales" (es decir, individuos en el estadio A según la clasificación de ACA/ACC), pacientes asintomáticos con enfermedad cardiaca estructural (estadio B según la clasificación de ACA/ACC) y el grupo de pacientes que presenta insuficiencia cardiaca (es decir, pacientes en el estadio C o en el estadio D según la clasificación de ACA/ACC).

30 Diferenciación entre un suceso cardiaco agudo y la enfermedad cardiaca crónica

35 En la presente memoria se da a conocer un método in vitro que ayuda al diagnóstico diferencial entre un suceso cardiaco agudo y la enfermedad cardiaca crónica, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador SLIM-1, medir opcionalmente en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, y establecer un diagnóstico diferencial entre un suceso cardiaco agudo y una enfermedad cardiaca crónica mediante la comparación de la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la concentración o concentraciones determinadas en la etapa (b) con la concentración de dicho marcador o de dichos marcadores con su valor o valores de referencia.

40 Al experto en la materia le resultarán familiares los significados de "suceso cardiaco agudo" y "enfermedad cardiaca crónica".

45 Preferentemente, un "suceso cardiaco agudo" se refiere a una condición, enfermedad o mal funcionamiento agudos del corazón, en particular a insuficiencia cardiaca aguda, por ejemplo infarto de miocardio (IM) o arritmia. Según la extensión de un IM, le puede seguir una EVI e ICC.

50 Preferentemente, una "enfermedad cardiaca crónica" es un debilitamiento de la función cardiaca, por ejemplo debida a isquemia del corazón, enfermedad arterial coronaria o uno o más infartos de miocardio previos, particularmente pequeños (posiblemente seguido de EVI progresiva). También puede ser un debilitamiento debido a enfermedades inflamatorias, defectos de válvulas cardiacas (por ejemplo defectos de la válvula mitral), cardiomiopatía dilatativa, cardiomiopatía hipertrófica, defectos del ritmo cardíaco (arritmias) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. De esta manera, resulta evidente que una enfermedad cardiaca crónica también puede incluir pacientes que han sufrido de un síndrome coronario agudo, por ejemplo IM, pero que actualmente no sufren de un suceso cardiaco agudo.

55 Resulta importante diferenciar entre un suceso cardiaco agudo y una enfermedad cardiaca crónica, debido a que un suceso cardiaco agudo y una enfermedad cardiaca crónica pueden requerir regímenes de tratamiento bastante diferentes. Por ejemplo, para un paciente que se presenta con infarto de miocardio agudo, el tratamiento precoz para la reperfusión puede ser de la máxima importancia. Por el contrario, un tratamiento de reperfusión realizado en un paciente con insuficiencia cardiaca crónica como máximo resulta en el mejor de los casos inocuo o de poco perjuicio para este tipo de paciente.

60 Evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad

5 En la presente memoria se da a conocer un método in vitro que ayuda a evaluar el riesgo de un paciente de IC de progresión de la enfermedad, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador SLIM-1, medir opcionalmente en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, y establecer el riesgo de dicho individuo de progresión de la enfermedad mediante la comparación de la concentración de SLIM-1 y opcionalmente la concentración o concentraciones determinadas para opcionalmente otro u otros marcadores con la concentración de dicho marcador o de dichos marcadores con su valor o valores de referencia.

10 Actualmente resulta muy difícil evaluar o incluso predecir con una probabilidad razonable si un paciente diagnosticado con IC presenta un estado más o menos estable o si la enfermedad progresará y en consecuencia es probable que empeore el estado de salud del paciente. La severidad y la progresión de la insuficiencia cardiaca habitualmente se establece clínicamente mediante la evaluación de los síntomas clínicos o mediante la identificación de cambios adversos mediante la utilización de tecnologías de obtención de imágenes, tales como la ecocardiografía. En una realización, el empeoramiento de la insuficiencia cardiaca se establece mediante el  
15 seguimiento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI). Un deterioro del FEVI de 5% o superior se considera progresión de la enfermedad.

20 Se da a conocer la utilización del marcador SLIM-1 en la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad para un paciente que sufre de IC. En la evaluación de la progresión de la enfermedad en pacientes que sufren de IC, un nivel elevado de SLIM-1 es un indicador de un riesgo incrementado de progresión de la enfermedad en los primeros estadios de la IC, mientras que un nivel disminuido de SLIM-1 es indicativo de insuficiencia cardiaca de estadio terminal.

25 Guía para la selección de una terapia apropiada para la IC

En la presente memoria se da a conocer un método in vitro que ayuda a seleccionar una terapia apropiada para la IC, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador SLIM-1, de medir  
30 opcionalmente en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca y de seleccionar una terapia apropiada mediante la comparación de la concentración de SLIM-1 y opcionalmente la concentración o concentraciones determinadas para opcionalmente otro u otros marcadores con la concentración de dicho marcador o de dichos marcadores con su valor o valores de referencia.

35 Se espera que el marcador SLIM-1 ayude al médico a seleccionar el régimen de tratamiento más apropiado de entre los diversos regímenes de tratamiento disponibles en el área de la insuficiencia cardiaca. Por lo tanto, una realización preferente adicional se refiere a la utilización del marcador SLIM-1 en la selección de un régimen de tratamiento para un paciente que sufre de IC.

Seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia

40 En la presente memoria se da a conocer un método in vitro para el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia de la IC, que comprende las etapas de: a) medir en una muestra la concentración del marcador SLIM-1, b) medir opcionalmente en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, y el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia de la IC mediante la comparación de la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la concentración o concentraciones determinadas en la etapa (b) con la  
45 concentración de dicho marcador o de dichos marcadores con su valor o valores de referencia.

50 Alternativamente, el método anteriormente indicado para el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia puede ponerse en práctica mediante el establecimiento de los niveles de marcador preterapéutico y postterapéutico de SLIM-1 y del otro u otros marcadores opcionales y mediante la comparación del nivel o niveles de los marcadores preterapéutico y postterapéutico.

55 El diagnóstico de la insuficiencia cardiaca ha sido establecido clínicamente. Según la presente invención, se considera que la IC se encuentra establecida clínicamente si un paciente cumple los criterios del estadio C o D según se define en las directrices prácticas de ACC/AHA. Según dichas directrices, el estadio C se refiere a pacientes con enfermedad cardiaca estructural y con síntomas previos o actuales de insuficiencia cardiaca. Los pacientes en el estadio D son aquellos pacientes con insuficiencia cardiaca refractaria que requieren intervenciones especializadas.

60 Tal como se ha indicado en mayor detalle anteriormente, los valores medidos de NT-proBNP presentan una elevada correlación con la severidad de la insuficiencia cardiaca. Sin embargo, tanto BNP como NT-proBNP aparentemente no resultan ideales para el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia; ver, por ejemplo, Beck-da-Silva L. et al., Congest. Heart Fail. 11:248-253, 2005, quiz 254-255.

El marcador SLIM-1 aparentemente resulta apropiado para el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia. De esta manera, la presente invención se refiere además a la utilización de SLIM-1 en el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia. En este área diagnóstica, el marcador SLIM-1 también puede utilizarse para establecer un valor de línea base anterior a la terapia y para medir SLIM-1 en un punto temporal o en varios  
 5 posteriormente a la terapia. En el seguimiento de los pacientes de IC, un nivel elevado de SLIM-1 es un indicador positivo de un tratamiento eficaz de la IC.

#### Combinación de marcadores

10 Los marcadores bioquímicos pueden determinarse individualmente o, en una realización preferente de la invención, pueden medirse simultáneamente utilizando una tecnología de matrices basada en chips o perlas. Las concentraciones de los biomarcadores seguidamente se interpretan independientemente utilizando un valor de corte individual para cada marcador o se combinan para la interpretación, es decir, forman una combinación de marcadores.

15 Tal como apreciará el experto en la materia, la etapa de correlacionar un nivel de marcador con una determinada probabilidad o riesgo puede llevarse a cabo y conseguirse de diferentes maneras. Preferentemente, los valores medidos del marcador SLIM-1 y del otro u otros marcadores se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la pregunta diagnóstica subyacente. Los valores del marcador pueden combinarse con la medición  
 20 de SLIM-1 mediante cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica.

Preferentemente, el algoritmo matemático aplicado en la combinación de marcadores es una función logística. El resultado de aplicar dicho algoritmo matemático o dicha función logística preferentemente es un único valor. Según la pregunta diagnóstica subyacente, dicho valor puede correlacionarse fácilmente con, por ejemplo, el riesgo de un  
 25 individuo de sufrir insuficiencia cardiaca o con otros usos diagnósticos deseados que ayuden en la evaluación de los pacientes con IC. En un modo preferente, dicha función logística se obtiene mediante: a) la clasificación de los individuos en los grupos, por ejemplo, de normales, individuos en riesgo de insuficiencia cardiaca, pacientes con insuficiencia cardiaca aguda o crónica, etc., b) la identificación de los marcadores que difieren significativamente entre estos grupos mediante análisis univariante, c) análisis de regresión logística para evaluar los valores  
 30 discriminantes independientes de los marcadores útiles en la evaluación de dichos diferentes grupos, y d) la construcción de la función logística para combinar los valores discriminantes independientes. En este tipo de análisis los marcadores ya no son independientes sino que representan una combinación de marcadores.

En una realización preferente, la función logística utilizada para combinar los valores de SLIM-1 y el valor de por lo  
 35 menos un marcador adicional se obtiene mediante: a) la clasificación de los individuos en grupos de normales e individuos en riesgo de insuficiencia cardiaca, respectivamente, b) el establecimiento de los valores para SLIM-1 y el valor de por lo menos un marcador adicional, c) la realización de un análisis de regresión logística, y d) la construcción de la función logística para combinar los valores de marcador de SLIM-1 y el valor de por lo menos un  
 40 marcador adicional.

Una función logística para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad preferentemente  
 45 utiliza un algoritmo desarrollado y obtenido mediante la aplicación de métodos estadísticos. Son métodos estadísticos apropiados, por ejemplo, el análisis discriminante (AD) (es decir, el ADN lineal, cuadrático, regularizado), los métodos núcleo (es decir MVS), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores del vecino k más próximo), MCP (mínimos cuadrados parciales), métodos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, métodos Random Forest, métodos de boosting/bagging), modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística), métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica difusa, redes neurales y métodos basados en algoritmos genéticos. El experto en la  
 50 materia podrá seleccionar fácilmente un método estadístico apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención y obtener de esta manera un algoritmo matemático apropiado. Preferentemente, el método estadístico utilizado para obtener el algoritmo matemático utilizado en la evaluación de la insuficiencia cardiaca se selecciona de entre el AD (es decir, el análisis discriminante lineal, cuadrático, regularizado), los métodos núcleo (es decir, MVS), los métodos no paramétricos (es decir, los clasificadores del vecino k más próximo), MCP (mínimos cuadrados parciales), métodos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, métodos Random-Forest, métodos de boosting) o modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística). Los detalles referentes a  
 55 dichos métodos estadísticos se encuentran en las referencias siguientes: Ruczinski I., et al., J. of Computational and Graphical Statistics 12:475-511, 2003; Friedman J.H., J. of the American Statistical Association 84:165-175, 1989; Hastie T., et al., The Elements of Statistical Learning, Springer Verlag, 2001; Breiman L. et al., Classification and regression trees, Wadsworth International Group, California, 1984; Breiman L., Machine Learning 45:5-32, 2001; Pepe M.S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28, Oxford University Press, 2003; y Duda R.O. et al., Pattern Classification, John Wiley & Sons, Inc., 2a edición, 2001.  
 60

Es una realización preferente de la invención utilizar un valor de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo normales de individuos en riesgo de insuficiencia cardiaca, pacientes de IC sensibles a la terapia y fracasos de la terapia, pacientes con insuficiencia cardiaca aguda y pacientes de IC con insuficiencia cardiaca crónica, pacientes de IC que muestran progresión de la enfermedad y pacientes de IC que no muestran progresión de la enfermedad, respectivamente.

El área bajo la curva de receptor-operador (=AUC) es un indicador del rendimiento o precisión de un procedimiento diagnóstico. La precisión de un método diagnóstico se describe mejor a partir de sus características de receptor-operador (CRO) (ver especialmente Zweig M.H. y Campbell G., Clin. Chem. 39:561-577, 1993). El gráfico de CRO es un gráfico de todas las parejas de sensibilidad/especificidad resultantes de modificar continuamente el umbral de decisión a lo largo del rango completo de datos observados.

El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su precisión diagnóstica, o de la capacidad de clasificar correctamente los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La precisión diagnóstica mide la capacidad del ensayo de distinguir correctamente entre dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Dichas condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad o progresión de enfermedad frente a falta de progresión de la enfermedad.

En cada caso, el gráfico CRO ilustra el solapamiento entre las dos distribuciones al dibujar la sensibilidad frente a 1-especificidad para el rango completo de umbrales de decisión. En el eje y está la sensibilidad, o la fracción de verdaderos positivos [definida como (número de resultados de ensayo verdaderos positivos)/(número de resultados de ensayo verdaderos positivos + número de resultados de ensayo falsos negativos)]. Lo anterior también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x está la fracción de falsos positivos o 1-especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de resultados verdaderos negativos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula enteramente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de verdaderos positivos y falsos positivos se calculan enteramente por separado, mediante la utilización de los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, el gráfico CRO es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto en el gráfico CRO representa una pareja de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones de resultados) presenta un gráfico CRO que pasa por la esquina superior izquierda, en la que la fracción de verdaderos positivos es 1,0, ó 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados para los dos grupos) es una línea diagonal que cruza a 45° de esquina inferior izquierda a esquina superior derecha. La mayoría de gráficos se encuentra entre estos dos extremos. (en el caso de que el gráfico CRO se encuentre completamente bajo la diagonal en 45°, ello se remedia fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor que" a "inferior a", o viceversa). Cualitativamente, cuanto más próximo se encuentre el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor precisión global del ensayo.

Un modo conveniente de cuantificar la precisión diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento mediante un único número. La medida global más común es el área bajo el gráfico CRO (AUC). Convencionalmente, dicha área siempre es  $\geq 0,5$  (en caso contrario, puede invertirse la regla de decisión para que lo sea). Los valores se encuentran comprendidos entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin ninguna diferencia aparente entre distribuciones de los dos grupos de valores de ensayo). El área no sólo depende de una parte particular del gráfico, tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad a una especificidad del 90%, sino del gráfico entero. Ésta es una expresión descriptiva, cuantitativa, de la proximidad del gráfico CRO a un gráfico perfecto (área=1,0).

La sensibilidad global del ensayo dependerá de la especificidad requerida para la práctica del método dado a conocer en la presente memoria. En determinados contextos preferentes, una especificidad de 75% puede resultar suficiente y los métodos estadísticos y algoritmos resultantes pueden basarse en este requisito de especificidad. En una realización preferente, el método utilizado para evaluar los individuos en riesgo de insuficiencia cardiaca se basa en una especificidad de 80%, de 85% o también preferentemente de 90% ó 95%.

Tal como se ha comentado anteriormente, el marcador SLIM-1 ayuda a evaluar el riesgo de un individuo de desarrollar insuficiencia cardiaca, así como una evaluación diagnóstica in vitro posterior de un paciente que presenta insuficiencia cardiaca. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una realización preferente es la utilización de SLIM-1 como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardiaca.

La utilización de una combinación de marcadores que comprende SLIM-1 y otro u otros marcadores de IC en la evaluación de los pacientes de IC o en la evaluación de los individuos en riesgo de IC representa una realización preferente adicional de la presente invención. En dicha combinación de marcadores, el otro u otros marcadores

preferentemente se seleccionan de entre el grupo que consiste de un marcador péptido natriurético, un marcador de troponina cardiaca y un marcador de inflamación.

5 El otro u otros marcadores de IC preferentes seleccionados con el que puede combinarse la medición de SLIM-1 preferentemente se seleccionan de entre el grupo que consiste de un marcador péptido natriurético, un marcador de troponina cardiaca y un marcador de inflamación. Estos otros marcadores preferentes cuya medición o mediciones preferentemente se combinan con la medición de SLIM-1 ó que forman parte de la combinación de marcadores de la IC que comprende SLIM-1, respectivamente, se comentan en mayor detalle posteriormente.

10 Marcador péptido natriurético

Un marcador péptido natriurético en el sentido de la presente invención es un marcador seleccionado de entre la familia del péptido natriurético auricular (PNA) o un marcador seleccionado de la familia del péptido natriurético cerebral (PNC).

15 Los marcadores polipeptídicos en la familia del péptido natriurético auricular o en la familia del péptido natriurético cerebral se derivan de las preproformas de las hormonas activas correspondientes.

20 Los marcadores péptidos natriuréticos preferentes según la presente invención son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP y fragmentos fisiológicos detectables inmunológicamente de los mismos. Tal como apreciará fácilmente el experto en la materia, el fragmento inmunológicamente detectable debe comprender por lo menos un epítipo que permita la detección específica de dicho fragmento fisiológico. Un fragmento fisiológico es un fragmento naturalmente presente en la circulación de un individuo.

25 Los marcadores en ambas familias de péptido natriurético representan fragmentos de las prohormonas correspondientes, es decir proANP y proBNP, respectivamente. Debido a que resultan aplicables consideraciones similares a ambas familias, sólo la familia del marcador BNP será descrita en cierto detalle. La prohormona de la familia de BNP, es decir, proBNP, consiste de 108 aminoácidos. proBNP es cortada en los 32 aminoácidos C-terminales (77-108), representando la hormona biológicamente activa BNP y los aminoácidos N-terminales 1-76 denominados proBNP N-terminales (o NT-proBNP). En la sangre circulan BNP, proBNP N-terminal (1-76), así como productos de degradación adicionales (Hunt P.J. et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 214:1175-1183, 1995). Si la molécula precursora completa (proBNP 1-108) también se encuentra en el plasma no se ha resuelto totalmente. Sin embargo, se describe (Hunt P.J. et al., Peptides 18:1475-1481, 1997) que una liberación baja de proBNP (1-108) en el plasma es detectable, pero que debido a la muy rápida degradación parcial en el extremo N-terminal, algunos aminoácidos se encuentran ausentes. Actualmente se acepta generalmente que, por ejemplo para NT-proBNP, la parte central de la molécula, que reside entre los aminoácidos 10 a 50, representa una parte fisiológicamente bastante estable. Las moléculas de NT-proBNP que comprenden esta parte central de NT-proBNP pueden medirse fiablemente a partir de líquidos corporales. Se proporciona una exposición detallada referente a los métodos basados en la detección inmunológica de dicha parte central de la molécula de NT-proBNP en el documento WO nº 00/45176 y se refiere al lector al mismo para más detalles. Puede resultar adicionalmente ventajoso medir únicamente una determinada subfracción de NT-proBNP para la que se ha propuesto la expresión NT-proBNP nativo. Se proporciona una exposición detallada referente a dicha subfracción de NT-proBNP en el documento WO nº 2004/099253. El experto encontrará todas las instrucciones necesarias en el mismo. Preferentemente, NT-proBNP se mide o corresponde a NT-proBNP medido con el ensayo Elecsys® de NT-proBNP de Roche Diagnostics, Alemania.

50 La preanalítica es robusta con NT-proBNP, lo que permite un fácil transporte de la muestra a un laboratorio central (Mueller T. et al., Clin. Chem. Lab. Med. 42:942-944, 2004). Las muestras de sangre pueden almacenarse a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o embarcarse sin pérdidas en la recuperación. Por el contrario, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C conduce a una pérdida de concentración de por lo menos 20% (Mueller T. et al., supra; Wu A.H. et al., Clin. Chem. 50:867-873, 2004).

55 La familia del péptido natriurético de origen cerebral (especialmente BNP y NT-proBNP) ha sido extensamente investigada en el cribado de determinadas poblaciones para IC. Los resultados con estos marcadores, especialmente con NT-proBNP son bastante alentadores. Los valores elevados de NT-proBNP, incluso en "pacientes" asintomáticos, son claramente indicativos de "problemas cardiacos" (Gremmler B. et al., Exp. Clin. Cardiol. 8:91-94, 2003). Estos autores han demostrado que NT-proBNP elevado indica la presencia de "distrés cardiorrenal" y debería llevar a su envío para una investigación adicional. En línea con algunos otros grupos de investigadores, Gremmler et al. también han encontrado que una concentración anormal de NT-proBNP es un ensayo diagnóstico exacto tanto para la exclusión de IC en la población y para el descarte de la disfunción ventricular izquierda (DVI) en sujetos disneicos. El papel de los valores negativos de BNP o NT-proBNP en el descarte de IC o DVI ha sido corroborado por otros grupos de investigadores; ver, por ejemplo, McDonagh T.A. et al., Eur. J. Heart

Fail. 6:269-273, 2004, y Gustafsson F. et al., J. Card. Fail. 11, supl. 5:S15-20, 2005.

5 La BNP es producida predominantemente (aunque no exclusivamente) en el ventrículo y es liberada con el incremento de la tensión de la pared. De esta manera, un nivel incrementado de BNP liberada refleja predominantemente disfunciones del ventrículo o disfunciones que se originan en las aurículas pero afectan al ventrículo, por ejemplo por alteraciones del flujo de entrada o sobrecarga de volumen sanguíneo. En contraste con BNP, ANP es producida y liberada predominantemente en la aurícula. Por lo tanto, el nivel de ANP refleja predominantemente la función auricular.

10 ANP y BNP son las hormonas activas y presentan una vida media más corta que sus contrapartidas inactivas correspondientes: NT-proANP y NT-proBNP. BNP es metabolizada en la sangre, mientras que NT-proBNP circula en la sangre como molécula intacta y en esta forma es eliminada renalmente. La vida media in vivo de NT-proBNP es 120 minutos más larga que la de BNP, que es de 20 minutos (Smith M.W. et al., J. Endocrinol. 167:239-246, 2000).

15 Por lo tanto, dependiendo del curso temporal o propiedades de interés, puede resultar ventajosa la medición de las formas activa o inactiva del péptido natriurético.

20 En la evaluación de un individuo en riesgo de insuficiencia cardiaca, el valor medido de SLIM-1 preferentemente se combina con el valor de NT-proANP y/o NT-proBNP. Preferentemente, el valor de NT-proBNP se combina con el valor de SLIM-1. Resultan aplicables consideraciones similares a la selección de una terapia apropiada, evaluando el riesgo de progresión de la enfermedad y realizando un seguimiento del curso de la enfermedad.

25 La exposición describe además la utilización de SLIM-1 en la evaluación de la respuesta de un paciente a la terapia. Su medición preferentemente se combina con la medición de ANP o BNP.

30 La exposición describe además la utilización de SLIM-1 para diferenciar entre la insuficiencia cardiaca aguda y crónica; la combinación de marcadores preferente comprende SLIM-1, ANP o proANP y BNP o proBNP.

35 Marcador de troponina cardiaca

40 La expresión troponina cardiaca se refiere a las isoformas cardiacas de la troponina I y troponina T. Tal como se ha indicado anteriormente, el término marcador se refiere además a variantes fisiológicas de la molécula marcadora, tales como fragmentos ó complejos fisiológicos. Para los marcadores de troponina cardiaca, es conocido que los complejos de los mismos presentes fisiológicamente son de relevancia diagnóstica y se incluyen expresamente en la presente memoria.

45 La troponina T presenta un peso molecular de aproximadamente 37.000 Da. La isoforma troponina T que se encuentra en el tejido cardiaco (cTnT) es suficientemente divergente de la TnT del músculo esquelético para permitir la producción de anticuerpos que distinguen estas dos isoformas de TnT. TnT es considerada un marcador del daño miocárdico agudo; ver Katus H.A. et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 21:1349-1353, 1989; Hamm C.W. et al., N. Engl. J. Med 327:146-150, 1992; Ohman E.M. et al., N. Engl. J. Med. 335:1333-1341, 1996; Christenson R.H. et al., Clin. Chem. 44:494-501, 1998; y patente EP nº 0 394 819.

50 La troponina I (TnI) es un elemento inhibidor de 25 kDa del complejo de troponina, observada en el tejido muscular. TnI se une a la actina en ausencia de  $Ca^{2+}$ , inhibiendo la actividad de ATPasa de la actomiosina. La isoforma TnI que se observa en el tejido cardiaco (cTnI) es 40% divergente respecto a la TnI del músculo esquelético, permitiendo distinguir inmunológicamente ambas isoformas. La concentración plasmática normal de cTnI es <0,1 ng/ml (4 pM). cTnI es liberada al flujo sanguíneo tras la muerte de las células cardiacas; de esta manera, la concentración plasmática de cTnI se encuentra elevada en los pacientes con infarto miocárdico agudo (Benamer H. et al., Am. J. Cardiol. 82:845-850, 1998).

55 Las isoformas cardiacas de carácter único de las troponinas I y T permiten distinguir las inmunológicamente de las demás troponinas de músculo esquelético. Por lo tanto, la liberación en la sangre de troponina I y T por el músculo cardiaco dañado puede relacionarse específicamente con la presencia de tejido cardiaco dañado. Actualmente el experto en la materia apreciará también que las troponinas cardiacas pueden detectarse en la circulación en su forma libre o como parte de un complejo (ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.333.397, nº 6.376.206 y nº 6.174.686).

60 En la evaluación de un individuo en riesgo de insuficiencia cardiaca, así como en la evaluación de un paciente que sufre insuficiencia cardiaca, el valor medido de SLIM-1 preferentemente se combina con el valor de la isoforma cardiaca de troponina T y/o troponina I. Una troponina cardiaca preferente utilizada en combinación con el marcador SLIM-1 es la troponina cardiaca T.



## Marcador de inflamación

Al experto en la materia le resultará familiar la expresión "marcador de inflamación". Los marcadores preferentes de inflamación son la interleuquina-6, la proteína C reactiva, el amiloide A sérico y una proteína S100.

La interleuquina-6 (IL-6) es una proteína secretada de 21 kDa que presenta numerosas actividades biológicas que pueden dividirse en las implicadas en la hematopoyesis y las implicadas en la activación de la respuesta inmunológica innata. IL-6 es un reactivo de fase aguda y estimula la síntesis de una diversidad de proteínas, incluyendo las moléculas de adhesión. Su función principal es mediar en la producción de fase aguda de las proteínas hepáticas, y su síntesis resulta inducida por las citoquinas IL-1 y TNF- $\alpha$ . IL-6 normalmente es producida por los macrófagos y los linfocitos T. La concentración sérica normal de IL-6 es <5 pg/ml.

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína homopentamérica de fase aguda de unión ligante de Ca<sup>2+</sup> con subunidades de 21 kDa que participa en la defensa del huésped. La síntesis de la PCR resulta inducida por la IL-6 e indirectamente por la IL-1, ya que IL-1 puede inducir la síntesis de IL-6 por las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. La concentración plasmática normal de PCR es < 3 mg/ml (30 nM) en el 90% de la población sana y <10 mg/ml (100 nM) en 99% de los individuos sanos.

El amiloide A sérico (=ASA) es una proteína de fase aguda de bajo peso molecular (11,7 kDa). Es sintetizada predominantemente por el hígado en respuesta a la estimulación por IL-1, IL-6 ó TNF- $\alpha$  y participa en la regulación de la respuesta inmunológica dependiente de las células T. Tras sucesos agudos, la concentración de ASA se incrementa hasta 1.000 veces, alcanzando un miligramo por mililitro. Se utiliza para monitorizar la inflamación en enfermedades tan diversas como la fibrosis quística, el rechazo del injerto renal, traumatismos o infecciones. En la artritis reumatoide en determinados casos se ha utilizado como sustituto de la PCR, aunque ASA todavía no es tan ampliamente aceptada.

Las proteínas S100 forman una familia en constante crecimiento de proteínas ligantes de Ca<sup>2+</sup> que actualmente incluye más de 20 elementos. La estructura fisiológicamente relevante de las proteínas S100 es un homodímero, aunque algunas también pueden formar heterodímeros entre sí, por ejemplo S100A8 y S100A9. Las funciones intracelulares van desde la regulación de la fosforilación de las proteínas, de las actividades enzimáticas o de la dinámica del citoesqueleto, hasta la participación en la proliferación y diferenciación celulares. Debido a que algunas proteínas S100 también son liberadas de las células, también se han descrito funciones extracelulares, por ejemplo la supervivencia neuronal, la proliferación de los astrocitos, la inducción de apoptosis y la regulación de los procesos inflamatorios. S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12 han sido observados en la inflamación, respondiendo S100A8 a la inflamación crónica, mientras que S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se encontraban incrementadas en la inflamación aguda. S100A8, S100A9, S100A8/A9 y S100A12 han sido asociados a diferentes enfermedades con componentes inflamatorios, incluyendo algunos cánceres, el rechazo del aloinjerto renal, la colitis y, más importante, a la AR (Burmeister G. y Gallacchi G., *Inflammopharmacology* 3:221230, 1995; Foell D. et al., *Rheumatology* 42:1383-1389, 2003). Los marcadores S100 más preferentes para evaluar un individuo en riesgo de IC o un paciente que presenta IC, por ejemplo, para la utilización en una combinación de marcadores según la presente invención son S100A8, S100A9, heterodímero S100A8/A9 y S100A12.

La selectina sE (molécula 1 soluble de adhesión a leucocitos endoteliales, ELAM-1) es una glucoproteína transmembranal de tipo I de 115 kDa expresada únicamente sobre las células endoteliales y sólo tras la activación por citoquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) o una endotoxina. La selectina E de superficie celular es un mediador de la adhesión por rodamiento de los leucocitos al endotelio, una etapa esencial en la extravasación de los leucocitos en el sitio de la inflamación, desempeñando de esta manera una función importante en la respuesta inflamatoria localizada. La selectina E soluble se encuentra en la sangre de los individuos sanos, probablemente surgida del corte proteolítico de la molécula expresada en superficie. Se ha informado de niveles elevados de selectina-Es en suero en una diversidad de condiciones patológicas (Gearing A.J.H. y Hemingway I., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 667:324-331, 1992).

En una realización preferente, la presente invención se refiere a la utilización de proteína SLIM-1 como molécula marcadora de IC en combinación con una o más moléculas marcadores de IC en la evaluación de la IC a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

Tal como se ha indicado anteriormente, en un método preferente según la presente invención, el valor medido de SLIM-1 se combina por lo menos con el valor de por lo menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste de un marcador péptido natriurético, un marcador de troponina cardiaca y un marcador de inflamación.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a la utilización de la combinación de marcadores SLIM-1 y NT-proBNP en la evaluación de la insuficiencia cardiaca.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a la utilización de la combinación de marcadores SLIM-1 y troponina T en la evaluación de la insuficiencia cardiaca.

5 En una realización preferente, la presente invención se refiere a la utilización de la combinación de marcadores SLIM-1 y PCR en la evaluación de la insuficiencia cardiaca.

En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a una combinación de marcadores que comprende los marcadores SLIM-1, troponina T, NT-proBNP y PCR.

10 En todavía una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a un panel de marcadores utilizado en un método para evaluar la IC in vitro con marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de SLIM-1 y de otro u otros marcadores de IC y utilizar las concentraciones determinadas en la evaluación de la IC.

15 Un panel de marcadores según la presente invención preferentemente se mide utilizando una técnica de matriz de proteínas. Una matriz es una colección de marcadores individuales localizables. Dichos marcadores pueden ser espacialmente localizables, tales como matrices contenidas dentro de placas de microtitulación o impresas sobre superficies planas en las que cada marcador se encuentra presente en coordenadas X e Y diferentes. Alternativamente, los marcadores pueden ser localizables basándose en etiquetas, perlas, nanopartículas o propiedades físicas. Las micromatrices pueden prepararse según los métodos conocidos por el experto ordinario en la materia (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.807.522; Robinson W.H. et al., Nat. Med. 8:295-301, 2002; Robinson W.H. et al., Arthritis Rheum. 46:885-893, 2002). El término matriz tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier ensayo inmunológico con múltiples marcadores localizables. En una realización, los marcadores localizables son antígenos. En otra realización, los elementos localizables son autoanticuerpos. Una micromatriz es una forma miniaturizada de una matriz. El término "antígeno" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier molécula que puede unirse específicamente a un anticuerpo. El término autoanticuerpo está bien definido en la técnica.

20 En una realización preferente, la presente invención se refiere a una matriz de proteínas que comprende el marcador SLIM-1 y opcionalmente otro u otros marcadores de IC.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a una matriz de proteínas que comprende los marcadores SLIM-1 y NT-proBNP.

35 En una realización preferente, la presente invención se refiere a una matriz de proteínas que comprende los marcadores SLIM-1 y troponina T.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a una matriz de proteínas que comprende los marcadores SLIM-1 y PCR.

40 En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a una matriz de proteínas que comprende los marcadores SLIM-1, troponina T, NT-proBNP y PCR.

45 Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

#### Descripción de las figuras

50 Figura 1 Análisis fenotípicos de los ratones de tipo salvaje y R9C. (A) Se generaron curvas de supervivencia de los ratones de tipo salvaje (n=79) y de los ratones R9C (n=44) tras un periodo de 24 semanas. (B) Acortamiento cardiaco evaluado mediante ecocardiografía (=fracción de acortamiento). Se inicia una alteración funcional significativa en los animales transgénicos R9C tan pronto como a las 8 semanas de edad.

55 Figura 2 Parámetros ecocardiográficos y hemodinámicos en ratones de tipo salvaje y en ratones AB. (A) Cambios de la presión máxima en mmHg tras 2, 4 y 8 semanas de la cirugía. (B) Cambio en el % de fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) tras 2, 4 y 8 semanas de la cirugía (los círculos negros indican datos de ratones falsamente operados y los círculos blancos indican datos de ratones con unión aórtica (AB)).

60 Figura 3 Datos de transferencia western obtenidos con tejido cardiaco procedente de ratones R9C y de control, respectivamente. Se observó una fuerte sobreexpresión de SLIM-1 en muestras de tejido derivadas de animales experimentales (R9C) que sufrían de insuficiencia cardiaca frente a muestras de tejido derivadas de ratones sanos (=+/+). Los números bajo las bandas teñidas indican los niveles relativos de expresión determinados por los números de los espectros de

masas registrados.

Figura 4 SLIM-1 medido en 10 muestras de IC y de control, respectivamente. Las densidades ópticas (DO) en el ensayo de SLIM-1 se proporcionan para muestras derivadas de pacientes con insuficiencia cardiaca, etiquetadas (IC=rombos) y para los controles sanos (suero humano normal=SHN=cuadrados), respectivamente.

Figura 5 SLIM-1 medido en 10 muestras de IC y de control, respectivamente. Se proporcionan las DO para SLIM-1 en muestras derivadas de pacientes con insuficiencia cardiaca, etiquetadas (IC) y para los controles sanos (suero humano normal=SHN=cuadrados), respectivamente. Los gráficos de caja y bigotes muestran los cuartiles inferior y superior (cajas), así como los valores máximo y mínimo (bigotes).

### Ejemplo 1

#### Modelos de ratón de insuficiencia cardiaca

##### 1.1 El modelo de ratón R9C

Se ha informado de que una cardiomiopatía dilatada humana hereditaria resultó de la conversión de Arg9 en Cys en el gen fosfolambano humano (PLN) (PLN-R9C) (Schmitt J.P. et al., Science 299:1410-1413, 2003). La aparición de la cardiomiopatía dilatada en los pacientes afectados típicamente se iniciaba durante la adolescencia, seguido del deterioro progresivo de la función cardiaca, conduciendo a crisis y mortalidad. Un modelo de ratón transgénico de dicha mutación mostró un fenotipo cardiaco similar, ya que los pacientes afectados se presentaban con cardiomiopatía dilatada, contractilidad cardiaca disminuida y muerte prematura (Schmitt, supra, 2003).

Los presentes inventores han establecido una curva de supervivencia para los ratones transgénicos. Los ratones PLN-R9C presentaban una mediana de supervivencia de sólo ~20 semanas, persistiendo menos de 15% más allá de las 24 semanas (fig. 1A). Las primeras muertes registradas en la línea PLN-R9C se observaron a las 12 semanas de edad, mientras que sólo un ratón de tipo salvaje de control murió durante el periodo de 24 semanas. Se seleccionó el punto de las ocho semanas como representativo de enfermedad de estadio "temprano" previamente a la primera mortalidad registrada, mientras que se seleccionó el punto de 16 semanas como el punto medio entre las 8 y las 24 semanas (DCM clásica). Un análisis detallado de la patología de los corazones aislados demuestra agrandamiento del ventrículo y las aurículas incluso a las 8 semanas de edad en los ratones PLN-R9C. Las secciones transversales de músculo cardiaco aislado (obtenidas de ratones de tipo salvaje y PLN-R9C seguido de tinción de hematoxilina y eosina también demostraron dilatación del ventrículo izquierdo o adelgazamiento de la pared ventricular, en los animales transgénicos a partir de las 8 semanas, con progresión continua de la dilatación con la edad.

Se llevaron a cabo mediciones cardiacas funcionales mediante ecocardiografía en ratones macho de 8, 16 y 24 semanas de edad (resumidas en la Tabla 1). Las mediciones ecocardiográficas del grosor de las paredes anterior y posterior demuestran que los ratones R9C presentaban una dilatación significativa a las 8 semanas, que continuaba deteriorándose durante el periodo de vida de los ratones. La contractilidad, evaluada por el acortamiento cardiaco (fig. 1B) también se había reducido ligeramente, aunque significativamente, a las 8 semanas, mientras que era claramente evidente una disminución más pronunciada a las 16 semanas. Los ratones hembra analizados mostraban resultados idénticos a los de los machos (datos no mostrados).

Tabla 1: Parámetros ecocardiográficos y hemodinámicos en ratones de tipo salvaje y R9C en ratones macho a las 8, 16 y 24 semanas.

	Tipo salvaje	R9C	Tipo salvaje	R9C	Tipo salvaje	R9C
Edad	8 sem.	8 sem.	16 sem.	16 sem.	24 sem.	24 sem.
Sexo	M	M	M	M	M	M
FC (lpm)	560±6	567±5	569±5	552±15	565±9	502±15*
GA (mm)	0,66±0,01	0,60±0,01*	0,70±0,01	0,58±0,01*	0,71±0,01	0,57±0,01*
GP (mm)	0,66±0,01	0,61±0,01*	0,70±0,01	0,59±0,01*	0,71±0,01	0,57±0,01*
DTDVI (mm)	3,82±0,05	4,01±0,03*	3,92±0,07	5,01±0,06*	3,99±0,05	5,48±0,08*
DTSVI (mm)	1,82±0,05	2,13±0,04*	1,84±0,06	3,36±0,09*	1,89±0,03	4,23±0,09*
FA (%)	52,7±0,9	47,6±1,2*	53,1±0,7	32,9±1,9*	52,9±1,5	22,6±2,1*
VCFc (circ/s)	10,5±0,2	9,1±0,2*	10,5±0,1	7,0±0,5*	10,9±0,3	5,1±0,5*
PAVc (cm/s)	102,4±2,4	97,8±2,6	110,1±3,7	85,3±3,2*	111,3±2,9	73,6±3,1*
AVA (m/s <sup>2</sup> )	65,7±1,3	60,6±1,6	66±32	47,9±2,5*	67,1±3,1	40±2,2*
Muestras (n)	6	9	6	9	5	5

Los valores en la Tabla 1 son medias ± SEM. Símbolos utilizados en la Tabla 1: FC=Frecuencia cardiaca; GA,

5 GP=grosor de pared anterior y posterior (ventrículo izquierdo); DTDVI, DTSVI=presión telediastólica y telesistólica del ventrículo izquierdo, respectivamente; FA=fracción de acortamiento=(DTDVI-DTSVI) / DTDVI x100%; TEC=tiempo de eyección corregido para FC; VACC=velocidad de acortamiento circunferencial corregido para FC=FA/TEC; VAMC=velocidad aórtica máxima corregida para FC; onda E=onda diastólica transmitral de llenado temprano; PTDVI, PTSVI=presión telesistólica y telediastólica del ventrículo izquierdo; +dP/dtmax=1ª derivada positiva máxima de la presión del ventrículo izquierdo; -dP/dtmax=1ª derivada negativa máxima de la presión del ventrículo izquierdo; AVA=aceleración de la velocidad aórtica (VAMc/tiempo de aceleración); \*P<0,05 en comparación con WT.

10 1.2 Modelo de ratón de bandas aórticas (BA)

En el presente modelo de ratón, la sobrecarga de presión causada por bandeo aórtico (BA) induce hipertrofia cardiaca.

15 Mediante intervención quirúrgica, se aplica una sobrecarga de presión en ratones C57BL. La coartación de la aorta ascendente (conocido como bandeo aórtico) induce hipertrofia cardiaca y crecimiento del músculo miocárdico, especialmente en el ventrículo izquierdo como respuesta primaria a la coartación de la aorta. En los últimos estados del presente modelo de ratón, el corazón se vuelve hipertrófico y finalmente dilatado. Este modelo ha sido bien caracterizado y ha demostrado ser altamente reproducible, con una tasa de mortalidad baja, de 10% a 15% o menos según la experiencia. Tras la coartación, este modelo animal permite evaluar el progreso del desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda y la insuficiencia cardiaca en respuesta al estrés hemodinámico.

20 Brevemente, se anestesiaron ratones C57BL con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y rompún (10 mg/kg) y se ligó la aorta utilizando una aguja de calibre 25. Los ratones falsamente operados se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico, excepto en que la ligación no se cerró contra la aguja.

25 Puntos temporales experimentales

30 Para examinar la respuesta hipertrófica primaria, así como la respuesta dilatada en un estadio posterior, se sacrificaron los animales bandeados y los controles falsamente operados, una, dos, cuatro y ocho semanas después de la intervención. Se evaluaron la función cardiaca y el desarrollo de hipertrofia mediante análisis ecocardiográfico y se confirmaron post mortem mediante examen histológico. La Tabla 2 muestra una vista general de la función cardiaca evaluada en los diversos puntos temporales mediante ecocardiografía. Los detalles de los parámetros ecocardiográficos proporcionados en la Tabla 2 son conocidos por el experto en la materia y pueden encontrarse en, por ejemplo, Ashai M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9199-9204, 2004, y Oudit G.Y. et al., Nat. Med. 9:1187-1194, 2003.

Tabla 2

Parámetro	Falsa op. sem. 2	BA sem. 2	Falsa op. sem. 4	BA sem. 4	Falsa op. sem. 8	BA sem. 8
Frecuencia cardiaca (lpm)	271,6 ± 31,2	286,3 ± 39,1	275,3 ± 25,8	276,5 ± 28,1	255,5 ± 23,9	310,8 ± 18,0
Volumen máximo (µl)	32,2 ± 2,3	36,4 ± 3,4	36,9 ± 1,1	40,8 ± 1,6	38,1 ± 1,5	48,9 ± 4,4
Volumen mínimo (µl)	13,7 ± 2,4	15,8 ± 3,3	14,7 ± 1,9	25,7 ± 0,9	18,4 ± 0,5	36,5 ± 3,7
Volumen telesistólico (µl)	14,7 ± 2,8	16,9 ± 3,3	15,5 ± 2,1	28,0 ± 0,7	19,3 ± 0,5	40,2 ± 4,3
Volumen telediastólico (µl)	30,6 ± 2,4	34,5 ± 3,2	35,2 ± 1,1	39,8 ± 1,6	36,8 ± 1,4	47,2 ± 4,1
Presión máxima (mmHg)	93,1 ± 3,5	149,2 ± 4,8	92,6 ± 0,8	153,5 ± 6,1	93,6 ± 5,0	169,8 ± 10,2
Presión mínima (mmHg)	4,9 ± 1,3	3,2 ± 0,4	3,6 ± 0,1	7,3 ± 3,6	4,1 ± 0,5	6,2 ± 1,9
Presión telesistólica (mmHg)	87,3 ± 4,3	139,4 ± 2,8	89,2 ± 1,0	149,6 ± 5,0	90,5 ± 4,9	168,3 ± 9,8
Presión telediastólica (mmHg)	14,0 ± 3,2	10,6 ± 2,7	13,0 ± 0,7	16,8 ± 4,8	16,5 ± 1,4	16,9 ± 3,1
Volumen eyectado (µl)	18,6 ± 1,0	20,6 ± 0,7	22,2 ± 2,3	15,1 ± 1,2	19,7 ± 1,4	12,4 ± 1,0
Fracción de eyección (%)	58,7 ± 5,1	57,9 ± 4,5	60,0 ± 5,3	36,8 ± 1,9	51,5 ± 1,6	25,8 ± 2,0
Gasto cardiaco (µl/min)	5113,5 ± 819,2	5879,1 ± 714,0	6114,8 ± 897,0	4108,6 ± 310,3	5066,0 ± 653,3	3893,8 ± 466,1

Trabajo sistólico (mmHg* $\mu$ L)	1339,6 $\pm$ 134,0	2196,3 $\pm$ 94,6	1577,8 $\pm$ 134,4	1477,8 $\pm$ 99,6	1451,8 $\pm$ 130,4	1179,2 $\pm$ 104,1
Elastancia arterial (Ea)(mmHg/ $\mu$ L)	4,8 $\pm$ 0,4	6,8 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,4	10,1 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 0,4	14,1 $\pm$ 1,7
dPdt max (mmHg/s)	5481,6 $\pm$ 491,1	6785,3 $\pm$ 434,2	6036,0 $\pm$ 352,9	5133,2 $\pm$ 621,4	5755,8 $\pm$ 652,9	6454,4 $\pm$ 712,0
dPdt min (mmHg/s)	-5049,6 $\pm$ 426,9	-7427,5 $\pm$ 685,3	-4743,3 $\pm$ 287,7	-5484,75 $\pm$ 412,2	-4564,5 $\pm$ 525,8	-7625 $\pm$ 586,5
dVdt max ( $\mu$ L/s)	883,0 $\pm$ 61,2	758,0 $\pm$ 29,8	856,5 $\pm$ 27,4	1152,8 $\pm$ 206,3	1188,0 $\pm$ 114,1	1041,2 $\pm$ 109,6
dVdt min ( $\mu$ L/s)	-679,6 $\pm$ 71,4	-696,3 $\pm$ 30,6	-703,5 $\pm$ 52,2	-921,0 $\pm$ 158,0	-1000,5 $\pm$ 76,8	-938,4 $\pm$ 126,2
P a la dVdt max (mmHg)	9,0 $\pm$ 2,5	7,4 $\pm$ 2,6	4,6 $\pm$ 0,4	10,3 $\pm$ 3,4	6,2 $\pm$ 1,0	13,3 $\pm$ 4,5
P a la dPdt max (mmHg)	44,1 $\pm$ 2,1	46,3 $\pm$ 3,5	49,0 $\pm$ 2,6	47,1 $\pm$ 2,8	49,6 $\pm$ 5,6	52,8 $\pm$ 3,6
V a la dPdt max ( $\mu$ L)	31,2 $\pm$ 2,4	35,5 $\pm$ 3,5	35,0 $\pm$ 1,1	39,7 $\pm$ 1,6	37,0 $\pm$ 1,5	47,3 $\pm$ 4,4
V a la dPdt min ( $\mu$ L)	14,7 $\pm$ 2,6	17,1 $\pm$ 3,2	15, $\pm$ 1,9	27,0 $\pm$ 0,7	19,2 $\pm$ 0,4	39,0 $\pm$ 4,3
Tau_w (ms)	11,4 $\pm$ 1,2	8,6 $\pm$ 0,7	10,7 $\pm$ 0,9	11,2 $\pm$ 1,3	11,3 $\pm$ 0,5	8,8 $\pm$ 0,4
Tau_g (ms)	15,8 $\pm$ 1,5	12,1 $\pm$ 1,2	17,5 $\pm$ 0,7	17,4 $\pm$ 1,0	17,5 $\pm$ 1,0	15,6 $\pm$ 1,0
Potencia máxima (mWatt)	6,4 $\pm$ 0,6	9,5 $\pm$ 0,4	6,8 $\pm$ 0,5	8,8 $\pm$ 0,5	7,3 $\pm$ 0,7	9,0 $\pm$ 0,5
Potencia máxima ajustada según la precarga (mWatt/-N5L <sup>2</sup> )	74,8 $\pm$ 16,5	85,0 $\pm$ 12,9	55,5 $\pm$ 2,4	57,3 $\pm$ 7,4	53,6 $\pm$ 3,0	46,1 $\pm$ 11,5

Además de la histología de los parámetros funcionales mediante tinción de hematoxilina/eosina (HE) realizada en tejido cardíaco de ratones BA y ratones de control a las 2, 4 y 8 semanas. La histología confirmó los procesos esperados de necrosis y remodelado de los ratones BA, mientras que el tejido cardíaco en los ratones falsamente operados no mostró ningún cambio significativo. Dos semanas después de la cirugía, el ventrículo de un ratón ligado mostraba hipertrofia significativa del ventrículo izquierdo que tras cuatro semanas había progresado adicionalmente y a las ocho semanas de la cirugía era estrechamente similar a la cardiomiopatía dilatada de estadio terminal.

## Ejemplo 2

Preparación de muestras y espectroscopía de masas

Homogeneización de corazones y aislamiento de orgánulos:

Se aislaron corazones, se extrajeron las aurículas, se trituraron cuidadosamente los ventrículos con una cuchilla y se enjuagaron extensivamente con PBS helado (solución salina tamponada con fosfato) para eliminar el exceso de sangre. Se homogeneizó el tejido durante 30 s utilizando un homogeneizador de vidrio manual con émbolo suelto en 10 ml de tampón de lisis (sacarosa 250 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, DTT (ditiotreitól) 1 mM y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM). Todas las etapas posteriores se llevaron a cabo a 4°C. El lisado se centrifugó en una centrífuga de laboratorio a 800xg durante 15 minutos; el sobrenadante sirvió de fuente de citosol, mitocondrias y fracciones microsómicas. El pellet que contenía los núcleos se diluyó en 8 ml de tampón de lisis y se aplicó en una capa sobre 4 ml de tampón de sacarosa 0,9 M (sacarosa 0,9 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, DTT 1 mM y PMSF 1 mM) y se centrifugó a 1.000xg durante 20 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 8 ml de un tampón de sacarosa 2 M (sacarosa 2 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM y PMSF 1 mM), se aplicó en una capa sobre 4 ml de tampón de sacarosa 2 M y se peletizó mediante ultracentrifugación a 150.000xg durante 1 h (rotor Beckman SW40.1). Los núcleos se recuperaron en forma de un pellet. Se aislaron las mitocondrias del sobrenadante mediante recentrifugación a 7.500xg durante 20 minutos a 4°C; el pellet resultante se lavó dos veces en tampón de lisis. Se peletizaron los microsomas mediante ultracentrifugación del citoplasma post-mitocondrial a 100.000xg durante 1 h en un rotor Beckman SW41. El sobrenadante sirvió como fracción citosólica (=cito).

Extracción de orgánulos:

Se extrajeron proteínas mitocondriales solubles mediante incubación de las mitocondrias en tampón de lisis

hipotónico (HEPES 10 mM, pH 7,9, DTT 1 mM, PMSF 1 mM) durante 30 minutos sobre hielo. La suspensión se sonicó brevemente y se eliminaron los residuos mediante centrifugación a 13.000xg durante 30 minutos. El sobrenadante sirvió como fracción "mito 1". El pellet insoluble resultante se resuspendió en tampón de extracción con detergente de membranas (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 0,4 M, glicerol al 15%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Triton-X-100 al 1,5%) y se agitó suavemente durante 30 minutos, seguido de centrifugación a 13.000xg durante 30 minutos; el sobrenadante sirvió de fracción "mito 2".

Las proteínas asociadas a las membranas se extrajeron mediante resuspensión de los microsomas en tampón de extracción con detergente de membranas. La suspensión se incubó bajo agitación suave durante 1 h y se eliminaron los residuos insolubles mediante centrifugación a 13.000xg durante 30 minutos. El sobrenadante sirvió como fracción "micro".

Digestión de extractos de orgánulos y análisis MudPIT:

Una alícuota de aproximadamente 100 mg de proteínas totales (determinadas mediante ensayo de Bradford) de cada fracción se precipitaron durante la noche con 5 vol. de acetona helada a aproximadamente 20°C, seguido de centrifugación a 13.000xg durante 15 minutos. El pellet de proteínas se solubilizó en un volumen reducido de urea 8 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, DTT 1 mM, durante 1 h a 37°C, seguido de la carboxiamidometilación con yodoacetamida 5 mM durante 1 h a 37°C en la oscuridad. A continuación, las muestras se diluyeron a urea 4 M con un vol. igual de bicarbonato amónico 100 mM, pH 8,5, y se digirieron con una proporción 1:150 veces de endoproteinasa Lys-C (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canadá) a 37°C durante la noche. Al día siguiente, las muestras se diluyeron a urea 2 M con un vol. igual de bicarbonato amónico 50 mM, pH 8,5, suplementado con CaCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 1 mM, y se incubaron durante la noche con perlas de tripsina Poroszyme (Applied Biosystems, Streetsville, Ontario, Canada) a 30°C con rotación. Las mezclas de péptidos resultantes se extrajeron en fase sólida con cartuchos SPEC-Plus PT C18 (Ansys Diagnostics, Lake Forest, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se almacenaron a -80°C hasta la utilización posterior. Se preparó un procedimiento totalmente automatizado de 20 h de duración en 12 etapas multiciclo MudPIT tal como se ha descrito (Mol. Cell Proteom. 2:96-106, 2003). Brevemente, se sincronizó una bomba cuaternaria de HPLC con un espectrómetro de masas con trampa de iones LCQ DECA XP (Thermo Finnigan, San Jose, CA). Una microcolumna capilar de sílice fundido de 100 mm de d.i. (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) se estiró hasta una punta fina utilizando un "puller" laser P-2000 (Sutter Instruments, Novato, CA) y se empaquetó con 8 cm de resina XDB-C18 Zorbax Eclipse de 5 mm (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada), seguido de 6 cm de resina de intercambio catiónico fuerte Partisphere de 5 mm (Whatman, Clifton, NJ). Se cargaron las muestras individuales manualmente en columnas separadas utilizando un recipiente de presión. Las condiciones de solvente cromatográfico eran exactamente las indicadas en Kislinger T. et al., Mol. Cell Proteom. 2:96-106, 2003.

Identificación de proteínas y validación:

El algoritmo de búsqueda en la base de datos SEQUEST se utiliza para hacer corresponder los espectros de masas en tándem de péptidos con las secuencias peptídicas en una base de datos formateada para FASTA mínimamente redundante mantenida localmente que contiene las secuencias de proteínas de ratón y humanas obtenidas de las bases de datos Swiss-Prot/TrEMBL e IPI. Para evaluar estadísticamente la tasa empírica de falso acierto para controlar y, por lo tanto, minimizar las identificaciones falsamente positivas, se buscan en todos los espectros las secuencias de proteínas en las orientaciones tanto normal (directa) como inversa de los aminoácidos (Kislinger T. et al., Mol. Cell Proteom. 2:96-106, 2003). A continuación, se aplica el algoritmo de filtración STATQUEST a todos los resultados de búsqueda putativos con el fin de obtener una medida de la fiabilidad estadística (puntuación de confianza) para cada identificación candidata (valor p de corte  $\leq 15$ , correspondiente a una probabilidad de 85% o superior de ser una correspondencia correcta). Las correspondencias de alta confianza se analizan en una base de datos de tipo SQL del propio laboratorio utilizando un "script" basado en Perl. La base de datos está diseñada para incluir resultados de búsqueda de base de datos e información espectral (cabeceras de barrido) para múltiples péptidos que correspondan a una proteína dada, conjuntamente con información referente al nombre de la muestra, el número de experimento, la etapa de MudPIT, el orgánulo de origen, la secuencia de aminoácidos, la masa molecular, el punto isoeléctrico, la carga y el nivel de confianza. Sólo las proteínas con un valor p de confianza predicho de 95% o superior y para las que se han detectado colectivamente por lo menos dos espectros, se conservan para el análisis posterior.

### Ejemplo 3

Evaluación estadística de los datos obtenidos en los sistemas modelo

3.1 Métodos estadísticos utilizados para generar los valores de p de expresión diferencial para el modelo de ratón R9C

Los datos en bruto obtenidos con los métodos descritos en el Ejemplo 2 consisten de 6.190 proteínas, cada una de las cuales presenta recuentos espectrales, la suma de todos los espectros asociados a la proteína, para cada una de las 137 diferentes series experimentales. Los datos en bruto, 6.190 subconjuntos de proteínas, se someten a normalización global que en primer lugar separa los datos dentro de cada análisis en un número igual de grupos, fijado en 100 para el presente análisis, basándose en sus recuentos espectrales. LOESS (Cleveland, W.S. and Devlin, S.J., Journal of the American Statistical Association 83:596-610, 1988) seguidamente se lleva a cabo en cada grupo (1 -100) ajustando para las diferencias en recuentos espectrales en un conjunto de genes con recuentos espectrales similares.

Basándose en los datos en bruto, los presentes inventores construyeron dos modelos lineales; el primer modelo utilizaba control/enfermedad, tiempo (8S, 16S, final) y localización (cito, micro, mitol, mitoll) como factores y se describe a continuación:

$$\text{recuento de análisis} = \beta_0 + \beta_1 \text{ tiempo} + \beta_2 \text{ tiempo}^2 + \beta_3 \text{ localización} + \beta_4 \text{ control} \quad (1)$$

El segundo modelo utiliza sólo el tiempo (8S, 16S, final) y la localización (cito, micro, mitol, mitoll) como factores y se describe a continuación:

$$\text{recuento de análisis} = \beta_0 + \beta_1 \text{ tiempo} + \beta_2 \text{ tiempo}^2 + \beta_3 \text{ localización} \quad (2)$$

en el que  $\beta_0$  es el término de intersección y  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$  son las estimaciones de la pendiente de las variables, tiempo, tiempo al cuadrado, localización y control/enfermedad.

Los dos modelos se compararon utilizando un Anova, con la hipótesis nula de que no existía ninguna diferencia entre los dos modelos. Un valor bajo de p indica que no existen pruebas suficientes para afirmar que los dos modelos son iguales. La información adicional indica que el estado (es decir, control/enfermedad) es un componente significativo del modelo. Con el fin de extraer las proteínas que presentan un cambio significativo en la abundancia relativa de las proteínas entre los modelos de control y de enfermedad, la lista de los presentes inventores de 6.190 proteínas se ordenó basándose en sus valores p calculados. Ello generó un conjunto de 593 proteínas con valores de  $p < 0,05$ .

Con el fin de considerar el ensayo de múltiples hipótesis a partir del modelo anterior, seguidamente los valores de p se corrigieron utilizando la corrección de la tasa de falso acierto (TFA), concretamente la corrección TFA de Benjamini-Hochberg (Benjamini Y. y Hochberg Y., Journal of the Royal Statistical Society B. 57:289-300, 1995). Ello generó un conjunto de 40 proteínas con valores de  $p < 0,05$  para el modelo de ratón R9C.

3.2 Métodos estadísticos utilizados para generar valores de p de expresión diferencial para el modelo de ratón de bandeo aórtico

Se aplicó el mismo análisis de los datos a los conjuntos de datos para el modelo de ratón de bandeo aórtico descrito anteriormente para el modelo de ratón R9C.

#### Ejemplo 4

Detección del marcador SLIM-1 mediante ensayo de transferencia western

Se obtuvieron lisados de tejido en bruto de muestras de tejido cardíaco de ratones R9C. Brevemente, se trituró el tejido cardíaco, se molió en un homogeneizador Dounce y se sometió a centrifugación a 8.000 g durante 30 minutos para separar los núcleos y residuos celulares. Se utilizó el sobrenadante para la transferencia western.

Se llevaron a cabo SDS-PAGE y transferencia western utilizando reactivos y equipos de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Para cada muestra de tejido sometida a ensayo, se diluyeron 10 mg de la fracción citosólica en tampón para muestras SDS NuPAGE<sup>®</sup> (Invitrogen) y se calentaron durante 10 minutos a 95°C. Las muestras se analizaron en geles NuPAGE<sup>®</sup> 4-12% (Tris-glicina) en el sistema tampón de migración MES. La mezcla de proteínas separada en el gel se transfirió a membranas de nitrocelulosa utilizando el módulo de transferencia XCell II<sup>™</sup> de Invitrogen (Invitrogen) y el sistema de tampones de transferencia NuPAGE<sup>®</sup>. Las membranas se lavaron 3 veces en PBS/Tween-20 al 0,05% y se bloquearon con el tampón de bloqueo Roti<sup>®</sup>-Block (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) durante 2 h. El anticuerpo primario, el anticuerpo policlonal de conejo de la proteína de cuatro dominios y medio LIM (FHL-1) (IMG-3374, Imgenex/Cedarlane) se diluyó en tampón de bloqueo Roti<sup>®</sup>-Block y se incubó con la membrana durante 1 h. Las membranas se lavaron 6 veces en PBS/Tween-20 al 0,05%. El anticuerpo de SLIM-1 primario unido específicamente se marcó con un anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con

POD, se diluyó a 10 mU/ml en 0,5 x tampón de bloqueo Roti®-Block. Tras la incubación durante 1 h, las membranas se lavaron 6 veces con PBS/Tween-20 al 0,05%. Para la detección del anticuerpo anticonejo conjugado con POD unido, la membrana se incubó con el sustrato de transferencia western Lumi-LightPLUS (nº de pedido 2015196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se expuso a una película autorradiográfica.

5 En la figura 3 se muestran los resultados de un experimento típico. Se observa una fuerte sobreexpresión de SLIM-1 en muestras de tejido derivadas de animales experimentales R9C que sufren de insuficiencia cardiaca frente a las muestras de tejido derivadas en puntos temporales correspondientes procedentes de un ratón sano.

10 Ejemplo 5

ELISA para la medición de SLIM-1 en muestras de suero y plasma humanas

15 Para la detección de SLIM-1 en suero o plasma humano, se desarrollo un ELISA de tipo sándwich. Para la captura del antígeno, se utilizaron alícuotas de un anticuerpo policlonal anti-SLIM-1 obtenido mediante inmunización de conejos con SLIM-1 producido en células HEK y para la detección del antígeno se utilizó un suero producido en cabras con un fragmento SLIM consistente de los aminoácidos 233-246, respectivamente, y se conjugaron con biotina y digoxigenina, respectivamente.

20 Se incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-SLIM-1 biotinilado durante 60 minutos a una concentración de 10 mg/ml en 1x solución de PBS. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%, se bloquearon con PBS + BSA al 1% (albúmina de suero bovino) y después se lavaron nuevamente tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%. A continuación, los pocillos se incubaron durante 1 h con una dilución en serie de SLIM-1 recombinante como antígeno estándar o con muestras de suero o plasma diluido (1: 5) de pacientes o de individuos de control, respectivamente. Tras la unión de SLIM-1, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%. Para la detección específica de SLIM-1 unido, los pocillos se incubaron con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-SLIM-1 digoxigenilado durante 45 minutos a una concentración de 0,5 mg/ml en 1x PBS, BSA al 1%. Después, las placas se lavaron tres veces para eliminar el anticuerpo no unido. En una etapa posterior, los pocillos se incubaron con 75 mU/ml de conjugados anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 1633716) durante 30 minutos en 1x PBS, BSA al 1%. A continuación, las placas se lavaron seis veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos de antígeno-anticuerpo, los pocillos se incubaron con 100 µl de solución ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11685767) y se midió la densidad óptica (DO) tras 30 minutos a 405 y 492 nm con un lector de ELISA.

35 Se sometieron a ensayo 10 muestras de suero obtenido de pacientes diferentes con insuficiencia cardiaca (muestras de IC) y 10 sueros de donantes sanos normales (SHN). Tras llevar a cabo el procedimiento de ensayo descrito anteriormente, se obtuvieron los resultados siguientes (Tabla 3) con dichas muestras:

40 **Tabla 3: Resultados de ELISA de SLIM-1 (muestras de desarrollo de ensayo)**

Muestras IC	DO
5078	0,360
5084	0,553
5085	0,353
5100	0,442
5001	0,318
5104	0,475
5107	0,344
5112	0,361
5113	0,222
5114	0,427
MW	0,385
Muestras SHN	
2	0,232
33	0,465
36	0,299
41	0,305
44	0,349
51	0,164
57	0,336
60	0,206



62	0,117
77	0,163
MW	0,263

Los datos resumidos en la Tabla 3 también se representan en las figuras 4 y 5. Tal como resulta evidente de las figuras 4 y 5, los niveles de SLIM-1 de promedio son más elevados en los sueros obtenidos de pacientes con HF que los niveles observados en las muestras obtenidas de los individuos de control.

5

#### Ejemplo 6

Combinaciones de marcadores que comprenden el marcador SLIM-1 en la evaluación de la insuficiencia cardiaca

#### 10 Ejemplo 6.1 Combinación de marcadores NT-proBNP y SLIM-1

Se evaluó la combinación de marcadores NT-proBNP y SLIM-1 para la diferenciación de los pacientes en estadio B y en los estadios C más D, respectivamente. Se evaluó la precisión diagnóstica mediante el análisis de muestras líquidas individuales obtenidas de grupos bien caracterizados de individuos, es decir, 50 individuos en estadio B según los criterios de ACA/ACC para la clasificación de la IC y 50 pacientes que sufrían de IC y que se encontraban en el estadio C según los criterios de ACA/ACC para la clasificación de la IC. Se cuantificaron NT-proBNP medido con un ensayo disponible comercialmente (Roche Diagnostics, ensayo de NT-proBNP (nº de cat. 03 121 640 160 para el analizador de inmunoensayo Elecsys® Systems) y SLIM-1 medido tal como se ha indicado anteriormente, en una muestra de suero obtenida de cada uno de dichos individuos. Se llevó a cabo el análisis de CRO según Zweig M.H. y Campbell, supra. El poder discriminante para diferenciar los pacientes en el estadio C de los individuos en el estadio B para la combinación de SLIM-1 con el marcador establecido NT-proBNP se calculó mediante análisis discriminante regularizado (Friedman J.H., J. of the American Statistical Association 84:165-175, 1989).

15

20

#### 25 Ejemplo 6.2 Combinación de marcadores troponina T y SLIM-1

Se evaluó la combinación de marcadores de troponina T y SLIM-1 para la diferenciación de los pacientes que habían sufrido un suceso cardiaco agudo de los pacientes que sufrían enfermedad cardiaca crónica, respectivamente. Se evaluó la precisión diagnóstica mediante el análisis de muestras líquidas individuales obtenidas de grupos bien caracterizados de individuos, es decir, 50 individuos diagnosticados con un suceso cardiaco agudo y 50 individuos diagnosticados con enfermedad cardiaca crónica. Se cuantificaron la troponina T medida con un ensayo disponible comercialmente (Roche Diagnostics, ensayo de troponina T (nº de cat. 201 76 44 para el analizador de inmunoensayo Elecsys® Systems) y SLIM-1 medido tal como se ha indicado anteriormente, en una muestra de suero obtenida de cada uno de dichos individuos. Se llevó a cabo el análisis de CRO según Zweig M.H. y Campbell, supra. El poder discriminante para diferenciar los pacientes en el estadio C de los individuos en el estadio B para la combinación de SLIM-1 con el marcador establecido NT-proBNP se calculó mediante análisis discriminante regularizado (Friedman J.H., J. of the American Statistical Association 84:165-175, 1989).

30

35

#### Ejemplo 6.3 Combinación de marcadores SLIM-1 y PCR

Se evaluó la combinación de marcadores proteína C reactiva (PCR) y SLIM-1 para la diferenciación de los pacientes diagnosticados con una cardiomiopatía frente a controles que no sufrían ninguna enfermedad cardiaca de confusión, respectivamente. Se evaluó la precisión diagnóstica mediante el análisis de muestras líquidas individuales obtenidas de grupos bien caracterizados de 50 individuos con cardiomiopatía y 50 individuos de control sanos. Se cuantificaron la PCR medida con un ensayo disponible comercialmente (Roche Diagnostics, ensayo de la proteína PCR (ensayo de alta sensibilidad de proteína C reactiva Tina quant (látex), Roche nº de cat. 11972855 216) y SLIM-1 medido tal como se ha indicado anteriormente, en una muestra de suero obtenida de cada uno de dichos individuos. Se llevó a cabo el análisis de CRO según Zweig M.H. y Campbell, supra. El poder discriminante para diferenciar los pacientes en el estadio C de los individuos en el estadio B para la combinación de SLIM-1 con el marcador establecido NT-proBNP se calculó mediante análisis discriminante regularizado (Friedman J.H., J. of the American Statistical Association 84:165-175, 1989).

45

50

#### LISTADO DE SECUENCIAS

55

<110> Roche Diagnostics GmbH University of Toronto F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Utilización de SLIM-1 en la evaluación de la insuficiencia cardiaca

<130> 24163 WO

60

<150> EP07004740

ES 2 440 740 T3

<151> 2007-03-08

<160> 1

5 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 280

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Ala Glu Lys Phe Asp Cys His Tyr Cys Arg Asp Pro Leu Gln Gly
 1                               5                               10                               15

Lys Lys Tyr Val Gln Lys Asp Gly His His Cys Cys Leu Lys Cys Phe
                20                               25                               30

Asp Lys Phe Cys Ala Asn Thr Cys Val Glu Cys Arg Lys Pro Ile Gly
                35                               40                               45

Ala Asp Ser Lys Glu Val His Tyr Lys Asn Arg Phe Trp His Asp Thr
 50                               55                               60

Cys Phe Arg Cys Ala Lys Cys Leu His Pro Leu Ala Asn Glu Thr Phe
65                               70                               75                               80

Val Ala Lys Asp Asn Lys Ile Leu Cys Asn Lys Cys Thr Thr Arg Glu
                85                               90                               95

Asp Ser Pro Lys Cys Lys Gly Cys Phe Lys Ala Ile Val Ala Gly Asp
                100                               105                               110

Gln Asn Val Glu Tyr Lys Gly Thr Val Trp His Lys Asp Cys Phe Thr
                115                               120                               125

Cys Ser Asn Cys Lys Gln Val Ile Gly Thr Gly Ser Phe Phe Pro Lys
130                               135                               140
    
```

ES 2 440 740 T3

Gly Glu Asp Phe Tyr Cys Val Thr Cys His Glu Thr Lys Phe Ala Lys  
 145 150 155 160

His Cys Val Lys Cys Asn Lys Ala Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Tyr  
 165 170 175

Gln Asp Gln Pro Trp His Ala Asp Cys Phe Val Cys Val Thr Cys Ser  
 180 185 190

Lys Lys Leu Ala Gly Gln Arg Phe Thr Ala Val Glu Asp Gln Tyr Tyr  
 195 200 205

Cys Val Asp Cys Tyr Lys Asn Phe Val Ala Lys Lys Cys Ala Gly Cys  
 210 215 220

Lys Asn Pro Ile Thr Gly Phe Gly Lys Gly Ser Ser Val Val Ala Tyr  
 225 230 235 240

Glu Gly Gln Ser Trp His Asp Tyr Cys Phe His Cys Lys Lys Cys Ser  
 245 250 255

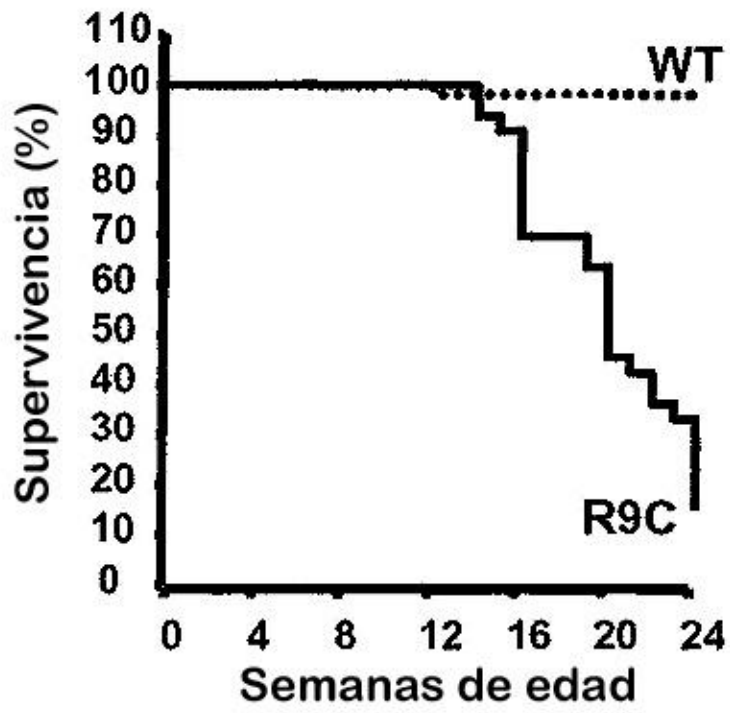
Val Asn Leu Ala Asn Lys Arg Phe Val Phe His Gln Glu Gln Val Tyr  
 260 265 270

Cys Pro Asp Cys Ala Lys Lys Leu  
 275 280

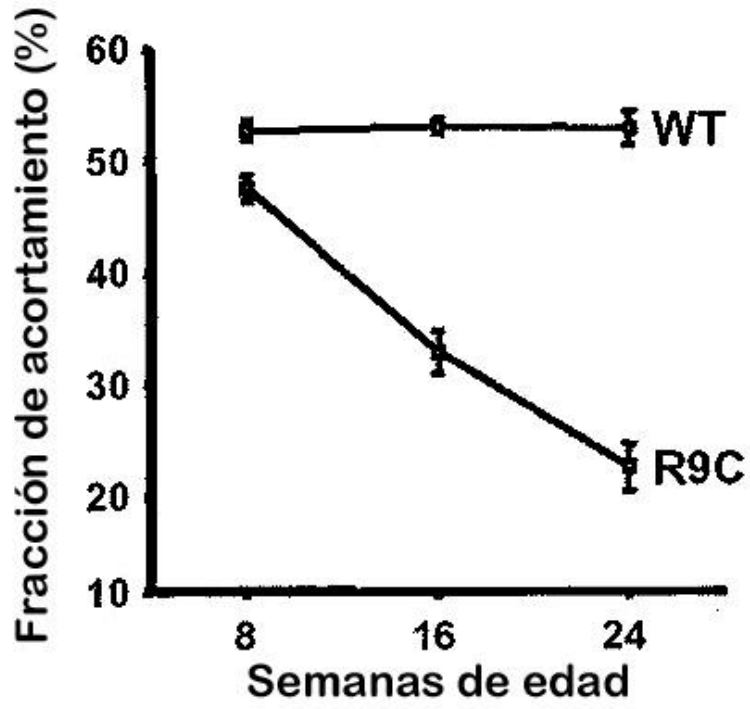
**REIVINDICACIONES**

1. Método para evaluar la insuficiencia cardiaca en un individuo, que comprende las etapas de:
- 5           a) medir en una muestra obtenida del individuo, la concentración proteica del marcador SLIM-1,  
b) evaluar la insuficiencia cardiaca mediante la comparación entre la concentración determinada en la etapa (a) y la concentración de este marcador establecida en una muestra de control, en la que un nivel incrementado de SLIM-1 es indicativo de insuficiencia cardiaca.
- 10       2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque adicionalmente dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa.
- 15       3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende además medir en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, en el que dicho otro u otros marcadores se seleccionan de entre el grupo que consiste de un marcador péptido natriurético, un marcador de troponina cardiaca y un marcador de inflamación.
- 20       4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque adicionalmente dicho otro u otros marcadores es NT-proBNP.
- 25       5. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque adicionalmente dicho otro u otros marcadores es troponina T.
- 30       6. Utilización in vitro de la proteína SLIM-1 como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardiaca, en la que un nivel incrementado de SLIM-1 en comparación con la concentración de este marcador establecida en una muestra de control es indicativo de insuficiencia cardiaca.
- 35       7. Utilización in vitro de una combinación de marcadores que comprende la proteína SLIM-1 y otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, en la que un nivel incrementado de SLIM-1 en comparación con la concentración de este marcador establecida en una muestra de control es indicativo de insuficiencia cardiaca.
- 40       8. Utilización in vitro de la combinación de marcadores según la reivindicación 7, en la que el otro u otros marcadores preferentemente se seleccionan de entre el grupo que consiste de un marcador péptido natriurético, un marcador de troponina cardiaca y un marcador de inflamación.
9. Utilización in vitro de una combinación de marcadores según la reivindicación 8, que comprende por lo menos SLIM-1 y NT-proBNP.
10. Método según la reivindicación 1, en el que el marcador SLIM-1 se mide en una muestra obtenida de un individuo en riesgo de insuficiencia cardiaca.

Fig. 1A



**Fig. 1B**



Función cardiaca en ratones BA y controles

Fig. 2A

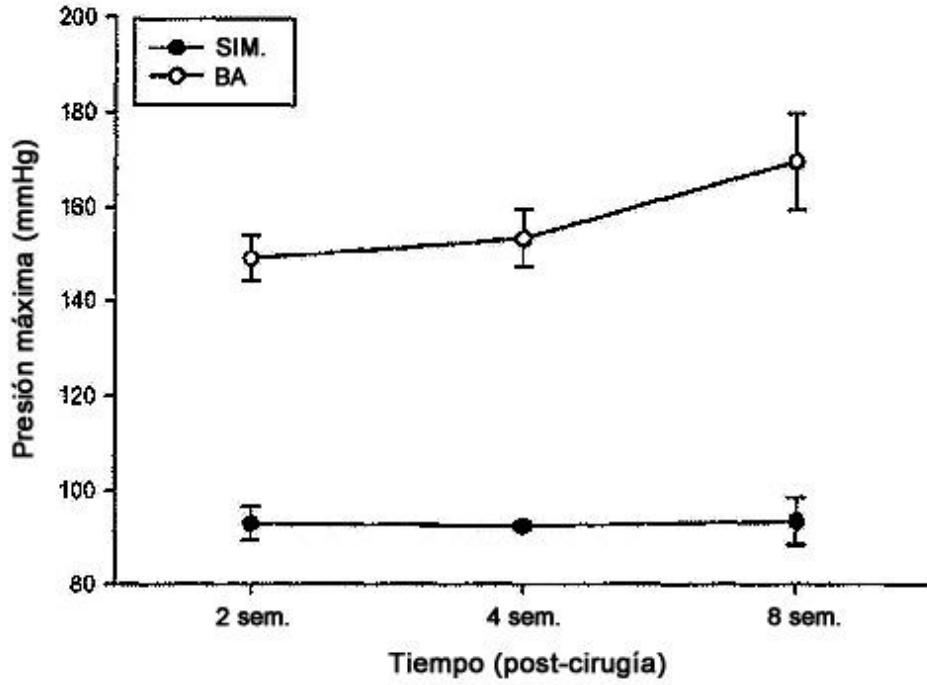


Fig. 2B

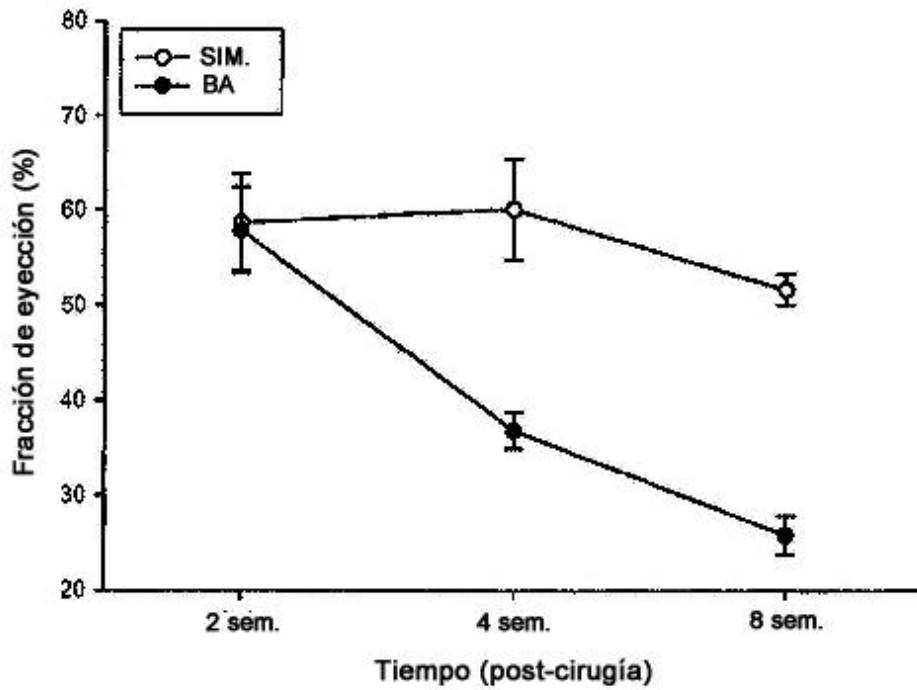


Fig. 3

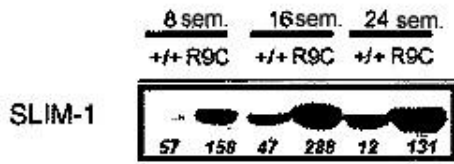
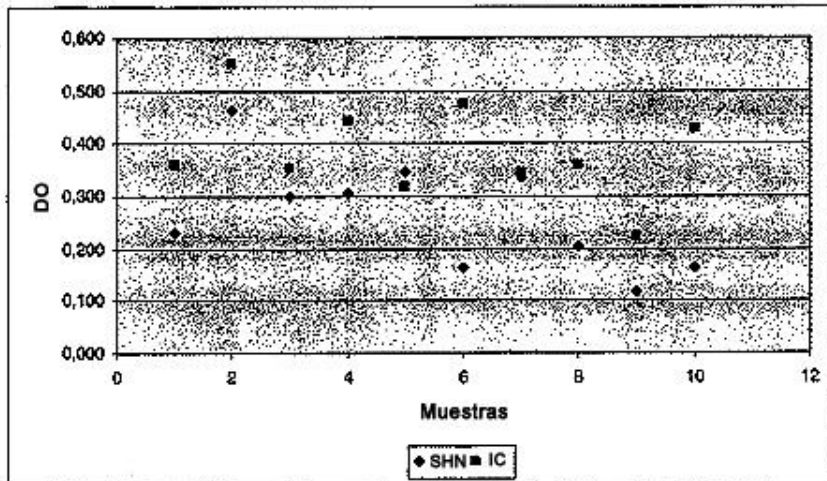


Fig. 4





**Fig. 5**

