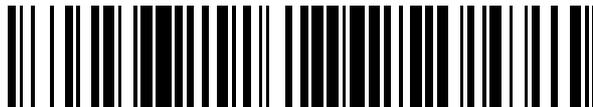


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 534**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2010 E 10723052 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2433139**

54 Título: **Troponina T cardiaca modificada después de la traducción como biomarcador de un riesgo de insuficiencia cardiaca**

30 Prioridad:

22.05.2009 EP 09305471

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

03.06.2014

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
INSTITUT PASTEUR DE LILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PINET, FLORENCE;
MULDER, PAUL;
BAUTERS, CHRISTOPHE y
RICHARD, VINCENT**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 464 534 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

Troponina T cardiaca modificada después de la traducción como biomarcador de un riesgo de insuficiencia cardiaca

5 Sector de la técnica

La presente invención proporciona nuevos biomarcadores para la detección de remodelación ventricular izquierda y la gestión y la valoración del riesgo de insuficiencia cardiaca. Por consiguiente, la invención proporciona métodos y kits de detección de remodelación ventricular izquierda.

10

Estado de la técnica

La insuficiencia cardiaca es hoy un problema de salud grave que afecta a más de cinco millones de personas en los Estados Unidos y registra aproximadamente 500.000 nuevos casos cada año y su prevalencia está creciendo de forma constante. Consiste en una afección en la que un problema con la estructura o función del corazón altera su capacidad para suministrar flujo sanguíneo suficiente para satisfacer las necesidades del organismo.

15

Esta patología es causada por diferentes factores y es el resultado de varios mecanismos complejos. Para el tratamiento clínico de este grave trastorno, el descubrimiento de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas parece tener una importancia creciente. Particularmente, para una monitorización más fácil, la investigación se centra ahora en biomarcadores séricos.

20

Un número creciente de enzimas, hormonas, sustancias biológicas y otros marcadores del sistema cardiaco se usan como biomarcador de trastornos cardiacos tales como insuficiencia cardiaca. Actualmente, entre los biomarcadores usados para el tratamiento de insuficiencia cardiaca después de infarto de miocardio aparecen troponina T sérica (Newby LK et al, 1998; Latini R et al, 2007) y troponina I, péptido natriurético de tipo B (BNP) y proteína C reactiva (CRP). Estos biomarcadores evalúan diferentes rutas que han estado implicadas en la patogenia de insuficiencia cardiaca: el BNP es elevado en respuesta a sobrecarga ventricular izquierda; la CRP es un marcador de inflamación; y elevaciones de troponina indican lesión miocítica.

25

30

Sin embargo, sigue existiendo una necesidad de nuevos biomarcadores para el tratamiento de insuficiencia cardiaca, para una detección o valoración más temprana del riesgo de dichos trastornos y ensayos más fáciles.

La remodelación ventricular izquierda después de infarto de miocardio se observa en aproximadamente el 30% de los pacientes a pesar de las modernas estrategias terapéuticas. Inicialmente, la remodelación ventricular izquierda puede considerarse un mecanismo protector que mantiene la función cardiaca de bombeo pero, en último término, conduce al deterioro de la función ventricular izquierda global y a insuficiencia cardiaca. Dado que el infarto de miocardio es un suceso frecuente (120000 casos/año en Francia), la remodelación ventricular izquierda es un importante contribuyente a la actual epidemia de insuficiencia cardiaca. El descubrimiento de marcadores circulantes específicos de remodelación permitiría el desarrollo de ensayos biológicos que predicen el desarrollo de insuficiencia cardiaca.

35

40

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un método in vitro para detectar una remodelación ventricular izquierda posterior a un infarto en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

45

- (i) medir el nivel de troponina T fosforilada en la mezcla de troponinas T en una muestra de sangre obtenida del sujeto,
- (ii) comparar dicho nivel con un control,
- (iii) en el que un nivel reducido de troponina T fosforilada en la muestra de sangre es indicativo de una remodelación ventricular izquierda.

50

Descripción detallada de la invención

Los inventores han demostrado que la troponina T modificada después de la traducción y, más particularmente, la troponina T fosforilada, es un biomarcador de remodelación ventricular izquierda, un proceso posterior a un infarto que conduce a insuficiencia cardiaca. De hecho, el nivel de fosforilación se reduce en el caso de remodelación ventricular izquierda. Además, el nivel de glucosilación de troponina T también ha sido estudiado y se incrementa en caso de remodelación ventricular izquierda. Por consiguiente, la troponina T modificada después de la traducción puede usarse como biomarcador de riesgo de insuficiencia cardiaca en un sujeto que sufrió un infarto.

55

60

Los inventores también demostraron que la troponina T modificada después de la traducción y, más particularmente, troponina T fosforilada, puede usarse como biomarcador de insuficiencia cardiaca en un sujeto que no sufrió ningún infarto. Pero sorprendentemente, los inventores han demostrado que un incremento del nivel de fosforilación y/o una reducción del nivel de glucosilación están correlacionados con un riesgo de insuficiencia cardiaca en un sujeto que

65

no sufrió ningún infarto.

Por lo tanto, la troponina T modificada después de la traducción puede usarse como biomarcador de insuficiencia cardiaca en sujetos que sufrieron o no un infarto, y como biomarcador de remodelación ventricular izquierda posterior a un infarto.

Definiciones

La expresión “Troponina T” (TnT) tiene su significado general en la técnica y se refiere a la forma cardiaca de troponina T, una proteína miofibrilar ya usada como biomarcador de trastornos cardiacos. La expresión puede incluir troponina T cardiaca y variantes y formas modificadas de la misma. La troponina T cardiaca puede ser de cualquier fuente, pero típicamente es una troponina T cardiaca de mamífero (por ejemplo, ser humano y primate no humano), particularmente una troponina T cardiaca humana. Una secuencia de aminoácidos de troponina T cardiaca nativa humana ejemplar se proporciona en P45359 (base de datos Swiss-Prot) y una secuencia de aminoácidos nativa de rata ejemplar se proporciona en P50753 (base de datos Swiss-Prot).

De acuerdo con la invención, la expresión “troponina T fosforilada” se refiere a una forma particular de la troponina T que está fosforilada en una serina. Concretamente, la proteína humana está fosforilada en la serina 207 (véase la posición 207 de P45379 (aminoácidos 1-297)) y la proteína de rata está fosforilada en la serina 208 (véase la posición 208 de P50753 (aminoácidos 1-298)), teniendo en cuenta la retirada del iniciador metionina (UniProtKB/Swiss-Prot Comunicado 57.1 del 14 de abril de 2009: 412525 entradas).

De acuerdo con la invención, la expresión “troponina T glucosilada” se refiere a una forma particular de troponina T que está glucosilada con un monosacárido, β -N-acetilglucosamina, que es un enlace O-glucosídico denominado O-GlcNAc.

De acuerdo con la invención, la expresión “mezcla de troponinas T” se refiere a todas las formas de troponina T contenidas en la muestra biológica obtenida del sujeto, que pueden estar modificadas después de la traducción o no. Por lo tanto, la mezcla incluye troponina T no modificada, troponina T fosforilada y troponina T glucosilada.

Los términos “biomarcador” y “marcador” se usan en el presente documento de forma intercambiable. Estos se refieren a una sustancia que es un indicador característico de un proceso biológico, suceso biológico y/o afección patológica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, primate, perro, gato, cabra, caballo, cerdo, ratón, rata, conejo y similares), que puede estar aquejado de insuficiencia cardiaca, pero puede o puede no tener la enfermedad. En una realización particular de la presente invención, el sujeto es un ser humano. En particular, el sujeto puede ser un paciente.

La expresión “muestra biológica” se usa en el presente documento en su sentido más amplio. Una muestra biológica se obtiene generalmente de un sujeto. Una muestra puede ser de cualquier tejido o fluido biológico con el que puedan ensayarse biomarcadores de la presente invención. Frecuentemente, una muestra será una “muestra clínica”, es decir, una muestra obtenida de un paciente. Dichas muestras incluyen, aunque sin limitarse a, fluidos corporales que pueden contener o no células, por ejemplo, sangre (por ejemplo, sangre completa, suero o plasma). La expresión “muestra biológica” también abarca cualquier material obtenido procesando una muestra biológica. Los materiales obtenidos incluyen, aunque sin limitarse a, células (o su progenie) aisladas de la muestra o proteínas extraídas de la muestra. El procesamiento de una muestra biológica puede implicar una o más de: filtración, destilación, extracción, concentración, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos y similares.

De acuerdo con la invención, la muestra biológica es una muestra de sangre (sangre completa, suero o plasma).

Los términos “normal” y “sano” se usan en el presente documento de forma intercambiable. Estos se refieren a un sujeto que no ha mostrado ningún síntoma cardiovascular, y al que no se le ha diagnosticado insuficiencia cardiaca u otra enfermedad cardiovascular. Preferentemente, un sujeto normal no está tomando medicación que afecta al sistema cardiovascular y no se le ha diagnosticado ninguna otra enfermedad. En algunas realizaciones, los sujetos normales tienen sexo, edad y/o índice de masa corporal similares en comparación con el sujeto a partir del cual se obtuvo la muestra biológica a ensayar. El término “normal” también se usa en el presente documento para calificar una muestra obtenida de un sujeto sano.

En el contexto de la presente invención, el término “control”, cuando se usa para caracterizar a un sujeto, se refiere a un sujeto que está sano o a un paciente al que se le ha diagnosticado una enfermedad específica diferente de una enfermedad cardiovascular. La expresión “muestra de control” se refiere a una o más de una muestra, que se ha obtenido de un sujeto sano o de un paciente al que se le ha diagnosticado una enfermedad diferente de un trastorno cardiovascular.

En su significado más amplio, el término “prevenir” o “prevención” se refiere a prevenir que la enfermedad o

trastorno se aparezca en un sujeto al que aún no se le ha diagnosticado que la tenga.

En su significado más amplio, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a invertir, aliviar, inhibir el progreso del trastorno o afección a la que dicho término se aplica, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

La expresión "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra inapropiada cuando son administradas a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo.

Métodos predictivos de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a un método in vitro para detectar una remodelación ventricular izquierda posterior a un infarto en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (i) medir el nivel de troponina T fosforilada en la mezcla de troponinas T en una muestra de sangre obtenida del sujeto,
- (ii) comparar dicho nivel con un control,
- (iii) en el que un nivel reducido de troponina T fosforilada en la muestra de sangre es indicativo de una remodelación ventricular izquierda.

En una realización particular, dicho método puede comprender además las etapas de:

- (iv) medir el nivel de troponina T glucosilada en la mezcla de troponinas T en dicha muestra,
- (v) comparar dicho nivel con un control,
- (vi) en el que un nivel incrementado de troponina T glucosilada en dicha muestra es indicativo de una remodelación ventricular izquierda.

La remodelación ventricular izquierda es un complejo proceso posterior a un infarto que se produce en aproximadamente el 30% de los casos, que conduce a insuficiencia cardiaca a largo plazo.

De acuerdo con la invención, el nivel de troponina T fosforilada corresponde a la razón de troponina T fosforilada con respecto a troponina T total así como el nivel de troponina T glucosilada corresponde a la razón de troponina T glucosilada con respecto a troponina T total.

Típicamente, un nivel reducido de troponina T fosforilada corresponde al 50% o menos del nivel medido en una muestra de control.

De acuerdo con la invención, la troponina T fosforilada se usa como biomarcador de una remodelación ventricular izquierda posterior a un infarto en un sujeto.

Además, la troponina T glucosilada también puede usarse como biomarcador de una remodelación ventricular izquierda posterior a un infarto en un sujeto.

Los biomarcadores de la invención pueden detectarse mediante diferentes métodos bien conocidos en la técnica.

En una realización particular, los métodos de la invención comprenden poner en contacto a la muestra biológica con un socio de unión capaz de interactuar selectivamente con los biomarcadores presentes en la muestra biológica.

Por consiguiente, un socio de unión de troponina T fosforilada reconoce selectivamente la troponina T fosforilada, y no la troponina T no fosforilada, así como un socio de unión de troponina T glucosilada reconoce selectivamente la troponina T glucosilada, y no la troponina T no glucosilada.

El socio de unión puede ser un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal. En otra realización, el socio de unión puede ser un aptámero.

Los anticuerpos policlonales de la invención o un fragmento de los mismos pueden generarse de acuerdo con métodos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, entre cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Pueden usarse diversos adyuvantes conocidos en la técnica para mejorar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles para poner en práctica la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales de la invención o un fragmento de los mismos pueden prepararse y aislarse usando cualquier técnica que posibilite la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, aunque sin limitarse a, la técnica de hibridoma

descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de células B (Cote et al., 1983); y la técnica de EBV-hibridoma (Cole et al. 1985).

5 Como alternativa, técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase por ejemplo la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla dirigidos contra biomarcadores de la invención. Los anticuerpos útiles para poner en práctica la presente invención también incluyen fragmentos antibiomarcadores que incluyen, aunque sin limitarse a, fragmentos F(ab')₂, que pueden generarse mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir la rápida identificación de fragmentos que tienen la especificidad deseada por biomarcadores de la invención. Por ejemplo, puede usarse presentación en fagos de anticuerpos. En dicho método, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o Fab se expresan en la superficie de un bacteriófago adecuado, por ejemplo, M13. En resumen, células esplénicas de un huésped adecuado, por ejemplo, ratón, que ha sido inmunizado con una proteína son extirpadas. Las regiones codificantes de las cadenas VL y VH se obtienen de aquellas células que están produciendo el anticuerpo deseado contra la proteína. Estas regiones codificantes se fusionan a continuación con un extremo de una secuencia del fago. Una vez que el fago se ha insertado en un portador adecuado, por ejemplo, bacterias, el fago presenta el fragmento de anticuerpo. La presentación en fagos de anticuerpos también puede proporcionarse mediante métodos combinatorios conocidos por los expertos en la materia. Los fragmentos de anticuerpo presentados por un fago pueden usarse a continuación como parte de un inmunoensayo.

25 Los ejemplos de anticuerpos monoclonales para troponina T disponibles en el mercado incluyen aquellos obtenidos de Abcam (clon 1A11, 2F3 y 1F11) y Santa Cruz (clon 2G3). Los ejemplos de anticuerpos policlonales para troponina T disponibles en el mercado incluyen aquellos obtenidos de HyTest Ltd (ref: 4T19_2). Estos se usan para medir la razón entre la cantidad de biomarcador y la cantidad de troponina T total.

30 En otra realización, el socio de unión puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con afinidad y especificidad elevadas. Dichos ligandos pueden aislarse a través de Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX por sus siglas en inglés) de una biblioteca de secuencias aleatorias, tal como se describe en Tuerk C. 1997. La biblioteca de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una única secuencia. Posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas han sido revisados en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos están constituidos por regiones variables de anticuerpos limitadas desde el punto de vista conformacional presentadas por una proteína plataforma, tales como Tiorredoxina A de E. coli, que se seleccionan entre bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas et al., 1996).

40 Los socios de unión de la invención tales como anticuerpos o aptámeros pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualesquiera otras marcas conocidas en la técnica. En la técnica se conocen marcas que generalmente proporcionan (directa o indirectamente) una señal.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "marcado", con respecto al anticuerpo, pretende abarcar marcado directo del anticuerpo o aptámero acoplando (es decir, enlazando físicamente) una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o Indocianina (Cy5)) al anticuerpo o aptámero, así como marcado indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero de la invención puede estar marcado con una molécula radiactiva mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo las moléculas radiactivas incluyen, aunque sin limitarse a, un átomo radiactivo para estudios gammagráficos tales como I123, I124, In111, Re186, Re188.

50 Los ensayos mencionados anteriormente pueden implicar la unión del socio de unión (es decir, anticuerpo o aptámero) a un soporte sólido. Los soportes sólidos que pueden usarse en la puesta en práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microvaloración); cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o pocillos de microvaloración); látex de poliestireno (por ejemplo, microesferas o placas de microvaloración); fluoruro de polivinilidina; papel diazotizado; nylon membranas; microesferas activadas, microesferas magnéticamente sensibles y similares.

60 Los biomarcadores de la invención pueden detectarse usando técnicas de inmunodiagnóstico convencionales, incluyendo inmunoensayos tales como ensayos de competencia, reacción directa o de tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, aunque sin limitarse a, ensayos de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunolectroforesis; inmunoprecipitación.

65 Más particularmente, puede usarse un método ELISA, en el que los pocillos de una placa de microvaloración están

revestidos con un conjunto de anticuerpos dirigidos contra biomarcadores de la invención. Una muestra biológica que contiene o de la que se sospecha que contiene dicho biomarcador o biomarcadores se añade a continuación a los pocillos revestidos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la placa o placas pueden lavarse para retirar restos no unidos y añadirse una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable. A la molécula de unión secundaria se le permite reaccionar con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, la placa se lava y la presencia de la molécula de unión secundaria se detecta usando métodos bien conocidos en la muestra.

Detectar el biomarcador o biomarcadores (con o sin métodos basados en inmunoensayo) también puede incluir la separación de los compuestos: centrifugado basado en el peso molecular del compuesto; electroforesis basada en la masa y la carga; HPLC basada en la hidrofobia; cromatografía de exclusión molecular basada en el tamaño; y afinidad por fase sólida basada en la afinidad del compuesto por la fase sólida particular que se usa. Una vez separados, los biomarcadores de la invención pueden identificarse en base al "perfil de separación" conocido por ejemplo, tiempo de retención, para ese compuesto y medirse usando técnicas convencionales.

Como alternativa, los compuestos separados pueden detectarse y medirse mediante, por ejemplo, un espectrómetro de masas.

El nivel de troponina T total puede medirse mediante dichos métodos, usando un socio de unión que reconoce todas las formas de troponina T, incluyendo troponina T fosforilada y glucosilada.

Kits de la invención

Se desvelan kits que comprenden materiales útiles para llevar a cabo métodos de predicción de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos de diagnóstico/predicción proporcionados en el presente documento pueden ser realizados por laboratorios de diagnóstico, laboratorios experimentales o facultativos. La invención proporciona kits que pueden usarse en estos diferentes entornos.

Material y reactivos para detectar biomarcadores específicos de la invención en una muestra biológica para detectar una remodelación ventricular izquierda o predecir un riesgo de insuficiencia cardiaca en un sujeto pueden reunirse conjuntamente en un kit.

En una realización, un kit comprende al menos un anticuerpo u otro socio de unión de troponina T fosforilada y un anticuerpo u otro socio de unión de troponina T, siendo capaz dicho anticuerpo o socio de unión de troponina T de unirse a todas las formas de troponina T.

En otra realización, un kit comprende al menos un anticuerpo u otro socio de unión de troponina T fosforilada y un anticuerpo u otro socio de unión de troponina T glucosilada. El kit también puede contener un socio de unión de todas las formas de troponina T.

El socio de unión puede estar marcado para una detección más fácil. Puede estar o no inmovilizado sobre la superficie de un sustrato (por ejemplo, microesferas, matriz y similares). Por ejemplo, un kit de la invención puede incluir una matriz para predecir el riesgo de insuficiencia cardiaca tal como se proporciona en el presente documento. Como alternativa, la superficie de un sustrato (por ejemplo membrana) puede estar incluida en un kit de la invención para inmovilización del socio de unión (por ejemplo, mediante electroforesis en gel y transferencia a membrana).

Además, un kit generalmente también comprende al menos un reactivo para la detección de un complejo entre el socio de unión incluido en el kit y el biomarcador de la invención.

Dependiendo del procedimiento, el kit puede comprender además uno o más de: tampón y/o reactivos de extracción, tampón y/o reactivos de transferencia de Western, y medios de detección. Los protocolos para usar estos tampones y reactivos para realizar diferentes etapas del procedimiento pueden estar incluidos en el kit.

Los diferentes reactivos incluidos en un kit de la invención pueden suministrarse en forma sólida (por ejemplo liofilizada) o líquida. Los kits pueden comprender opcionalmente diferentes recipientes (por ejemplo, vial, ampolla, tubo de ensayo, matraz o frasco) para cada tampón y/o reactivo individual. Cada componente será generalmente adecuado dividido en alícuotas en su recipiente respectivo o proporcionado en una forma concentrada. También pueden proporcionarse otros recipientes adecuados para realizar ciertas etapas de los métodos desvelados. Los recipientes individuales del kit se mantienen preferentemente encerrados para venta comercial.

En algunas realizaciones, un kit comprende instrucciones para usar sus componentes para la predicción de un riesgo de insuficiencia cardiaca en un sujeto de acuerdo con un método de la invención. Las instrucciones para usar el kit de acuerdo con métodos de la invención pueden comprender instrucciones para procesar la muestra biológica obtenida del sujeto y/o para llevar a cabo el ensayo, o instrucciones para interpretar los resultados. Un kit también puede comprender un folleto en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o

la venta de productos farmacéuticos o biológicos.

Figura 1: Reducción de TnT fosforilada en Ser²⁰⁷ humana en plasma de pacientes con remodelación VI después de IM. Análisis de transferencia de Western con anticuerpos contra TnT humana total (figura 1A) y contra la TnT fosforilada en Ser²⁰⁷ humana (figura 1B) en plasma (1 µl) de pacientes. La figura 1C muestra el análisis de la razón entre TnT humana total y TnT fosforilada en Ser²⁰⁷ humana. Las posiciones de *Pm* se indican a la derecha. La TnT humana total y la TnT fosforilada en Ser²⁰⁷ se cuantificaron en 2 poblaciones independientes (llamadas población 1 y población 2). Cada población se dividió en terciles de acuerdo con el porcentaje de remodelación VI, medido tal como se indica en materiales y métodos. El tercil 1 incluye pacientes con baja remodelación (recuadro blanco), el tercil 2 representa pacientes con remodelación intermedia (recuadro gris) y el tercil 3 representa pacientes con un alto grado de remodelación (recuadro negro). Los datos se expresan como medias de una unidad arbitraria (U.A.) ± error estándar de la media. * p < 0,001, † p < 0,0001.

Ejemplos

Estudios para pacientes con insuficiencia cardíaca que sufrieron un infarto de miocardio

Materiales y métodos

Animales. Todos los experimentos llevados a cabo en este estudio se ajustaban a la guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio publicada por los *National Institutes of Health* (Institutos Nacionales de Salud) estadounidenses (publicación NIH No. 85-23, revisada en 1996) y a la ley francesa. El infarto de miocardio (IM) se indujo en ratas Wistar macho de 10 semanas de edad (n = 32) (Charles River, Francia) mediante ligamiento de la arteria coronaria izquierda de acuerdo con los métodos descritos por Pfeffer et al y modificados por Mulder et al. Esto comprendía el grupo de IC (insuficiencia cardíaca). Otras 29 ratas se sometieron al mismo protocolo excepto que el asa no se ató, éste era el grupo con operación simulada o de control. A todas las ratas se les permitió comer pienso para ratas convencional y beber agua *ad libitum* y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12-h/12-h.

Siete días o dos meses después de la cirugía, cada animal se sometió a mediciones hemodinámicas y estudios ecocardiográficos (control e IC) antes del sacrificio y la extirpación del corazón, tal como se describió recientemente en Cieniewski-Bernard, C. et al, 2008. En resumen, el corazón se extirpó y se incubó en tampón de Krebs-Henseleit enfriado con hielo para retirar la sangre. Cada compartimento cardíaco se diseccionó a continuación cuidadosamente para extirpar todas las zonas necróticas. El VI se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C hasta el análisis. Las proteínas del VI se extrajeron mediante homogeneización de Dounce-Potter en hielo en 40 mmol/l de Tris-HCl, pH 9,5 que contenía antiproteasas (un comprimido para 20 ml de tampón, Complete™ sin EDTA, Roche Applied Science) y antifosfatasa (1/100, cóctel inhibidor de fosfatasa 1 y 2, Sigma-Aldrich) y PUGNac (50 µmol/l, CarboGen). La fracción soluble se transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml y las concentraciones de proteínas se determinaron con el ensayo de Bradford.

Pacientes. La remodelación VI se analizó en dos poblaciones independientes de pacientes incluidos durante 2002-2004 (población 1) y 2006-2007 (población 2) (Tabla 2). Para ambas series de pacientes, los criterios de inclusión eran hospitalización por un IM con onda Q anterior con al menos 3 segmentos del VI de la zona de infarto acinéticos en la ecocardiografía previa al alta. Los criterios de exclusión eran: calidad de la imagen ecográfica inadecuada, enfermedad no cardíaca que limita la calidad vida, enfermedad valvular significativa, o IM con onda Q anterior. Se llevaron a cabo estudios ecográficos secuenciales inmediatamente antes del alta hospitalaria y 1 año después del IM. Los datos ecográficos se obtuvieron con sistemas de imaginología de segundo armónico disponibles en el mercado, y las imágenes se registraron en discos ópticos. Se usó un protocolo de imaginología convencional en base a vistas apicales de 4 y 2 cámaras; Se registraron ecocardiogramas en 2D del eje corto del VI a partir de la región paraesternal izquierda a 3 niveles: válvula mitral, nivel del músculo papilar medio, y cúspide. Todos los ecocardiogramas se analizaron en el Laboratorio Lille Core Echo (Lille, Francia), tal como se ha descrito anteriormente en Savoye C et al, 2006⁵. Los volúmenes y la fracción de expulsión del VI se calcularon de acuerdo con una regla de Simpson modificada. El VI se dividió en un modelo de 16 segmentos para evaluar la función sistólica regional. La remodelación VI se expresó como el cambio porcentual en volumen diastólico final del VI (LVEDV) desde el inicial (previo al alta) hasta 1 año después: $(LVEDV_{1\text{año}} - LVEDV_{\text{inicial}}) / LVEDV_{\text{inicial}} \times 100$. Se obtuvieron muestras de sangre en tubos de EDTA para todos los pacientes en el momento de la inclusión durante la hospitalización inicial. El plasma se procesó y se almacenó a -80°C en un plazo de 2 horas.

Electroforesis en gel bidimensional (2-D), cuantificación de proteínas fosforiladas y análisis por espectrometría de masas. Se llevó a cabo electroforesis en gel bidimensional tal como se ha descrito anteriormente en Cieniewski-Bernard, C. et al, 2008. Proteínas del VI (500 mg) de ratas de control (n = 4) y con IC (n = 4) a los 2 meses después de la cirugía se analizaron, se mezclaron en una tira seca de 24 cm con un gradiente lineal de pH de 3-10 (Immobilin DryStrip, GE Healthcare). La etapa de rehidratación pasiva se llevó a cabo después de 9 h a 20°C sin corriente alguna. El enfoque se llevó a cabo a 20°C a 50 V durante 9 h (etapa de rehidratación activa), 200 V durante 1 h (progresión lineal), 1000 V durante 1 h (progresión lineal), 10.000 V durante 6 h (progresión lineal) y 10.000 V durante 4,5 h (progresión rápida). Los geles con tiras de IPG equilibradas se aplicaron a continuación a la parte superior de un gel Duracryl™ al 12% (Digilab® Genomic solutions). Se aplicaron cuadrados

de dos mm de papel de filtro que contenía 4 µl de patrones de peso molecular de fosfoproteína PeppermintStick™ (Molecular Probes™) a la parte izquierda del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 10°C con el gran sistema vertical Ettan Dalt^{†six} (GE Healthcare) en tampón de desplazamiento (25 mmol/l de Tris, 192 mmol/l de glicina, SDS al 0,1% (p/v), APS al 0,37% (p/v) y TEMED al 0,04% (v/v)) a 70 V durante una noche.

La tinción fluorescente de electroforesis 2-D con el colorante Pro-Q®Diamond Phosphoprotein Gel Stain se llevó a cabo fijando los geles en metanol al 30% (v/v) ácido acético al 5% (v/v) durante 2 h, lavando con H₂O 18 MΩ, incubando con el colorante Pro-Q®Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Molecular Probes™) durante 90 minutos y destiñendo lavando 3 veces con acetonitrilo al 20%. (ACN), (v/v) acetato sódico al 5% 1 mol/l, pH 4 (p/v) durante 30 minutos y mediante un lavado final con H₂O 18 MΩ durante 1 h. Se adquirieron imágenes de geles teñidos con Pro-Q®Diamond con un aparato Ettan Dige Imager (GE Healthcare) a una longitud de onda de excitación de 540 nm y una longitud de onda de emisión de 595 nm. Los geles se tiñeron a continuación para proteínas totales con colorante Sypro®Ruby Protein Gel Stain (Molecular Probes™) durante una noche y se destiñeron lavando una vez con H₂O 18 MΩ durante 10 minutos, dos veces con metanol al 10% (v/v), ácido acético al 7% (v/v) durante 10 minutos y dos veces más con H₂O 18 MΩ durante 10 minutos. Las imágenes de geles teñidos con Sypro®Ruby se adquirieron con el aparato Ettan Dige Imager a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

Las imágenes de los geles tenidos con Pro-Q®Diamond y Sypro®Ruby se exportaron a formato TIF y se importaron al software de análisis de imágenes en gel ImageMaster 2D Platinum®6.0 (GE Healthcare). Se detectaron manchas automáticamente de acuerdo con tres parámetros (uniforme, 10; área, 5; prominencia, 2). El fondo se eliminó de cada gel y las imágenes se editaron de forma manual, *por ejemplo*, añadiendo, dividiendo o eliminando manchas. El gel teñido con Pro-Q®Diamond se seleccionó como el gel de referencia o maestro y se usó para emparejamiento automático de manchas en el gel teñido con Sypro®Ruby correspondiente. Análisis de datos comparó los geles para las ratas de control (n = 4) y para las ratas con IC (n = 4). Después de que la edición de forma manual y el emparejamiento confirmaban las imágenes, el software analizó las diferencias en el volumen de la mancha de proteína. El volumen total de la mancha se calculó para cada imagen, y a cada mancha se le asignó un volumen de mancha normalizado como una proporción del volumen total de todas las manchas. Se evaluó la razón del porcentaje de volumen normalizado de una mancha detectada mediante Pro-Q®Diamond y aquel para la misma mancha detectada mediante Sypro®Ruby y a continuación se seleccionaron las manchas polipeptídicas para las cuales esta razón difería significativamente (p < 0,05) entre ratas de control y con IC.

Tal como se ha descrito recientemente en detalle en Cieniewski-Bernard, C. et al, 2008 y Pottiez G et al, 2009, las fosfoproteínas del VI (800 µg) se identificaron mediante un método de digestión en gel después de teñir con el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250, y las proteínas se identificaron con un espectrómetro de masas MALDI-TOF Voyager DE-STR PRO (PerSeptive Biosystems) y, para las manchas no identificadas en MALDI, con el flujo de trabajo de Proteineer™ de Bruker Daltonics (Bremen, Alemania).

Las masas de péptidos monoisotópicos se buscaron en las bases de datos de proteínas NCBI y Swiss-Prot con tres programas de software diferentes: Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>), ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/>) y Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). Las búsquedas en las bases de datos usaban diferentes características, es decir especie de rata, una escisión ausente, modificaciones químicas parciales (oxidación de metionina y carbamidometilación de cisteína) y un ajuste de tolerancia de masa de 50 ppm. Los criterios usados para aceptar las identificaciones incluían el valor de probabilidad, el número de péptidos emparejados (mínimo de 4 péptidos), el grado de cobertura de secuencia (>20%) y el peso molecular y el punto isoeléctrico de las proteínas identificadas.

Inmunoprecipitación y análisis por transferencia de Western. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con 25 ó 50 µg de proteínas del VI o 1 µl de plasma mezclado con 1 µg de anticuerpo diluido en tampón RIPA (10 mmol/l de Tris HCL, 150 mol/l de NaCl, IGEPAL® CA-630 al 10% (Sigma-Aldrich) (v/v), desoxicolato sódico al 0,5% (p/v), SDS al 10% (p/v), y ortovanadato sódico al 10% (p/v)). Después de la incubación a 4°C durante una noche en un dispositivo giratorio, los complejos inmunes precipitaron a 4°C durante 1 h en un dispositivo giratorio con nProtein A Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare). Los inmunoprecipitados se lavaron en primer lugar con tampón RIPA, a continuación con tampón RIPA al 90% (v/v), NaCl a 0,5 mol/l, a continuación con tampón RIPA al 50% (v/v), tampón TNE al 50% (v/v) (10 mmol/l de Tris HCl, 150 mmol/l de NaCl, 1 mmol/l EDTA) y finalmente con tampón TNE antes de la extracción en tampón Laemmli para análisis por transferencia de Western.

Las proteínas (de 25 a 50 µg de VI o 1 µl de plasma) del VI se separaron mediante SDS-PAGE (gel de acrilamida al 12%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond™ de 0,45 µm (GE Healthcare). La verificación de las cargas proteicas totales se confirmó visualmente mediante tinción con rojo Ponceau de la membrana. Las transferencias se lavaron a continuación en TBS-Tween, se saturaron en leche deshidratada desnatada o BSA al 5% (p/v) en TBS-Tween y se sometieron a inmunotransferencia durante una noche en solución de bloqueo con anticuerpos contra proteínas específicas. Los anticuerpos primarios eran contra residuos de fosfoserina (anticuerpo para p-serina monoclonal, clon PSR-45, P5747, Sigma-Aldrich, antes o después de la inmunoprecipitación), residuos de fosfotreonina (anticuerpo para p-treonina monoclonal, clon H-2, sc-5267, Santa Cruz Biotechnology®, antes o

después de la inmunoprecipitación), proteína quinasa C alfa (anticuerpo para PKC α policlonal, AHO0702, Invitrogen™, 50 μ g proteínas/pista, 1/250), proteína quinasa C delta (anticuerpo para PKC δ monoclonal, clon ZP012, 41-0300, Invitrogen™, 50 μ g, 1/250), proteína quinasa C épsilon (anticuerpo para PKC ϵ policlonal, AHO0743 Invitrogen™, 50 μ g, 1/1000), troponina I (anticuerpo para troponina I policlonal, #4002, Cell Signaling Technology®, 25 μ g, 1/1000), troponina I fosforilada en S23/24 (anticuerpo para fosfotroponina 1 policlonal, #4004, Cell Signaling technology®, 25 μ g, 1/500), troponina T (anticuerpo para troponina T-C monoclonal, clon 2G3, sc-33721, Santa Cruz Biotechnology®. 50 μ g antes o después de la inmunoprecipitación, 1/100) y restos de O-GlcNAc (Covance, 50 μ g o después de IP, 1/1000). Las transferencias se lavaron a continuación cinco veces en TBS-Tween durante 10 minutos cada una y a continuación se incubaron con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante durante 1 h en solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios eran anticuerpo completo de burros ECL™ enlazado a peroxidasa de rábano picante anti-IgG de conejo (NA934V, GE Healthcare) y anticuerpo completo de oveja ECL™ enlazado a peroxidasa de rábano picante anti-IgG de ratón (NA93 1V, GE Healthcare). Las membranas se lavaron cinco veces en TBS-Tween durante 10 minutos cada una. Las transferencias se incubaron a continuación con reactivos de detección de transferencia de Western de electroquimioluminiscencia mejorados (ECL™) (GE Healthcare). Se usó el aparato Ettan DIGE Imager (GE Healthcare) para la detección, con una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. La intensidad de las bandas se cuantificó con el software Quantity One® Image analyzer (Bio-Rad).

Anticuerpos específicos de troponina T y fosfotroponina T. Se desarrollaron anticuerpos policlonales anti-péptido contra la secuencia conservada 202-215 de troponina T de rata, específicos para TnT o TnT fosforilada en Ser²⁰⁸, de acuerdo con un protocolo convencional (inmunización de 3 meses, P.A.R.I.S society, Francia). Los anticuerpos policlonales se purificaron contra los péptidos de TnT fosforilada en Ser²⁰⁸ y no fosforilada para ensayar el reconocimiento de cada forma de troponina T. Los anticuerpos policlonales se purificaron para todos los experimentos. Para ensayar la especificidad de los anticuerpos, 50 μ g de proteínas del VI se trataron con 50 y 100 unidades de fosfatasa alcalina (M0290S, New England Biolabs) durante 18 horas a 37°C. Las proteínas se separaron a continuación mediante SDS-PAGE (gel de acrilamida al 12%), se transfirieron a membranas de PVDF y se sometieron a inmunotransferencia durante una noche en solución de bloqueo con anticuerpos contra TnT fosforilada en Ser²⁰⁸ o TnT (1/1000) preincubada con péptidos fosforilados o no fosforilados en Ser²⁰⁸ (aminoácidos 202-215) a una concentración final de 10 μ g/ml. Se llevaron a cabo análisis de transferencia de Western con los anticuerpos policlonales purificados, tal como se ha descrito anteriormente, con 50 μ g de proteínas del VI o 1 μ l de plasma de rata o humano.

Análisis estadístico. Las variables continuas se expresan como media \pm error estándar a menos que se indique otra cosa. Las diferencias de LVED (1 año frente a inicial) se evaluaron mediante el test t de Student emparejado. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante un test t de Student bilateral no emparejado o mediante ANOVA seguido por un procedimiento F de Scheffe para comparaciones a posteriori. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Análisis fosfoproteómico diferencial del ventrículo izquierdo en ratas modelo de control y con insuficiencia cardíaca a los 2 meses después de la cirugía. Este estudio investigaba cambios en el fosfoproteoma cardíaco en remodelación VI y disfunción en un modelo experimental de IM inducido mediante ligamiento de la arteria coronaria izquierda en ratas con IC y ratas operadas de forma simulada (control). Se midieron parámetros ecocardiográficos, hemodinámicos e histomorfométricos detallados en ratas anestesiadas 7 días y 2 meses después de la cirugía.

A los dos 2 meses, el análisis proteómico reveló diferentes patrones de fosfoproteoma del VI entre los grupos, con 32 ± 5 y 52 ± 8 manchas fosforiladas detectadas ($p = 0,013$) en ratas de control y con IC, respectivamente, aunque sus patrones de proteoma del VI eran similares (309 ± 49 y 284 ± 29 manchas). Usando el gel 2D que contenía más manchas, se seleccionaron 69 manchas fosforiladas de forma diferencial entre los grupos; 53 de ellas podían identificarse mediante espectrometría de masas. Estas proteínas se clasificaron en 8 categorías de acuerdo con su importancia funcional: chaperonas moleculares, proteínas de estrés oxidativo, enzimas metabólicas, proteínas de la cadena respiratoria, proteínas implicadas en la síntesis de ATP o en la ruta de cinina o en la regulación de la tensión arterial osmótica coloidal, y finalmente varios componentes de miofilamentos.

En la última categoría, el descubrimiento de que la fosforilación de troponina T (TnT) se modificó era especialmente interesante. La propia TnT es un biomarcador bien establecido en enfermedades cardiovasculares, y niveles elevados de TnT sérica están asociados con resultados clínicos alterados en afecciones que incluyen IM (Newby, LK et al, 1998) e IC (Latini R et al, 2007). Por lo tanto, se exploró el proceso de fosforilación de TnT reducida en IC con mayor profundidad.

Fosforilación de troponina T reducida en el VI de ratas con IC. Para verificar la observación de fosforilación de TnT reducida en experimentos en electroforesis en gel 2D, a continuación se determinó el sitio del aminoácido específico de fosforilación de la proteína y el grado al cual la fosforilación de TnT estaba modulada durante el curso de IC en los dos 2 meses después del IM.

Mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo específico contra TnT seguida por análisis por transferencia de Western con anticuerpos contra fosfoserina (Ser), fosfotreonina (Thr) o fosfotirosina (Tyr), se determinó que TnT estaba fosforilada en residuos Ser y Thr. El grado de fosforilación en residuos Ser de TnT en el VI de ratas con IC después de 2 meses se reducía significativamente, aunque no se observó ninguna modulación significativa de fosforilación en residuos de Thr de TnT. Además, la expresión de TnT total no difería entre ratas de control y con IC. Se observaron resultados similares en ratas con IC 7 días después del IM: la fosforilación en residuos de Ser de TnT se redujo significativamente.

Para confirmar que la modulación de la fosforilación era específica de TnT, se realizaron análisis por transferencia de Western de las mismas muestras, usando anticuerpos específicos contra troponina 1 (TnI) o TnI fosforilada en Ser^{23/24}, en vista de la sugerencia de que la fosforilación de Ser^{23/24} de TnI reducida podría explicar la diferencia funcional entre troponina de un corazón con insuficiencia y sin insuficiencia (Messer AE et al, 2007). En el modelo, no se observó ninguna variación en la expresión de TnI o TnI fosforilada en Ser^{23/24} en ratas con IC o ratas de control, 7 días o 2 meses después de la cirugía.

A continuación se investigaron las proteínas de señalización asociadas con la modulación de la fosforilación en Ser de TnT. Los análisis bioinformáticos (NetPhos 2.0 Server, PhosphoSitePlus™ y Scansite) sugerían que solamente serina en la posición 208 (en la secuencia de TnT de rata) podía fosforilarse, y que los aminoácidos que rodean a Ser²⁰⁸ eran sitios de consenso para proteína quinasa C (PKC) y para proteína fosfatasa 2A (PP₂A).

Reducción de troponina T fosforilada en Ser²⁰⁸ en el VI y el plasma de ratas con IC, evaluada con anticuerpos específicos. Se sintetizó el fosfopéptido, incluyendo residuos de aminoácidos 202-215 de la secuencia de TnT de rata (aminoácidos 1-298), con Ser²⁰⁸ fosforilada. Esta secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre las especies humana (Ser²⁰⁷), ratón (Ser²¹⁰), conejo (Ser²¹⁰) y vaca (Ser¹⁹⁴). Se generaron anticuerpos policlonales contra la secuencia peptídica y se purificaron contra los péptidos de TnT tanto fosforilada como no fosforilada, y se estudiaron sus especificidades. Ambos anticuerpos detectaban TnT del VI de rata a 34 kDa. Se caracterizó la especificidad del anticuerpo por la forma fosforilada en Ser²⁰⁸ de TnT con los péptidos tanto fosforilado en Ser²⁰⁸ como no fosforilado. La unión del anticuerpo se suprimió solamente con el péptido fosforilado en Ser²⁰⁸. En contraste, la unión del anticuerpo purificado contra el péptido no fosforilado se suprimió mediante incubación con ambos péptidos; esto indica que este anticuerpo reconocía la TnT total y no solamente su forma no fosforilada. Para confirmación adicional de la especificidad del anticuerpo por TnT fosforilada en Ser²⁰⁸, se trataron proteínas del VI con fosfatasa alcalina para eliminar todos los restos fosfato. De nuevo, se suprimió la unión del anticuerpo.

A continuación, se examinó la reactividad cruzada del anticuerpo con otras troponinas para TnT fosforilada en Ser²⁰⁸. La secuencia de TnI correspondiente tenía 5/14 aminoácidos en común con TnT de rata y 0/14 con humana, y los residuos de serina estaban ausentes en ambas especies. También se usaron anticuerpos específicos para inmunoprecipitación de TnI total o fosforilada en Ser^{23/24} a partir de proteínas del VI. El análisis por transferencia de Western con anticuerpos para TnT fosforilada en Ser²⁰⁸ y total no produjo ninguna señal y, por lo tanto, demostró una falta de reactividad cruzada con TnI.

A continuación, se usaron estos anticuerpos específicos para TnT fosforilada en Ser²⁰⁸ y para TnT total, para cuantificar de forma precisa el grado de fosforilación en Ser²⁰⁸ de TnT en ratas con IC, y para confirmar los datos obtenidos mediante métodos indirectos. Usando el anticuerpo contra TnT total, no se descubrió ninguna modificación de la expresión de TnT en el VI de ratas con IC a los 2 meses y se confirmó el nivel reducido de la forma fosforilada en Ser²⁰⁸ de TnT en su VI. La razón de TnT fosforilada en Ser²⁰⁸ con respecto a TnT total era, por lo tanto, significativamente más baja en estas ratas. Los resultados fueron similares para ratas con IC a los 7 días.

A continuación se investigó si la modulación de fosforilación en Ser²⁰⁸ de TnT también podía detectarse y cuantificarse en el plasma de ratas con IC. La TnT total se incrementó modestamente (en un factor de 1,7) pero significativamente en el plasma de las ratas con IC a los 2 meses, y como en el VI, se observó una reducción significativa de TnT fosforilada en Ser²⁰⁸ en su plasma. Los resultados eran similares para las ratas con IC a los 7 días. En ambos puntos temporales, la razón de TnT fosforilada en Ser²⁰⁸ con respecto a TnT total cuantificada en plasma era significativamente más baja en ratas con IC que en ratas de control.

Reducción de troponina T fosforilada en Ser²⁰⁷ humana en plasma de pacientes con remodelación VI.

El descubrimiento de una reducción específica de TnT fosforilada en Ser²⁰⁸ en el plasma de ratas con IC después de IM sugería que la TnT fosforilada circulante podría ser un biomarcador de remodelación VI en pacientes con IM. Dado que los anticuerpos policlonales también reconocían específicamente la secuencia de TnT fosforilada en Ser²⁰⁷ humana, se cuantificó la TnT fosforilada circulante en 2 poblaciones diferentes de pacientes con IM anterior. El seguimiento ecocardiográfico completo se obtuvo para la mayoría de los pacientes durante todo el primer año después del IM. En ambas poblaciones, un incremento progresivo del volumen del VI desde el inicial hasta 1 año indicaba remodelación VI. El proceso de remodelación se producía a pesar del uso casi sistemático de medicamentos anti-remodelación incluyendo inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina y betabloqueantes.

Se obtuvieron muestras de sangre para análisis de TnT a los 7 ± 3 días después del IM en la población 1, y a los 5 ± 1 días después del IM en la población 2. Los pacientes se dividieron en terciles de remodelación VI de acuerdo con sus volúmenes diastólicos finales del VI, medidos un año después del IM; el primer tercil comprendía los pacientes con la menor remodelación, el segundo tercil aquellos con remodelación intermedia y el tercer tercil, aquellos con la mayor remodelación. El uso de medicamentos antirremodelación era similar entre los 3 grupos. Tal como muestra la figura 1, la expresión de TnT total en la población 1 no difería en los terciles de remodelación VI, mientras que, en la población 2, se observó un incremento moderado aunque no significativo de la expresión de TnT total en pacientes con remodelación intermedia y elevada. La TnT fosforilada en Ser²⁰⁷ se redujo significativamente en ambas poblaciones y la razón TnT fosforilada en Ser²⁰⁷/TnT total se redujo de forma muy significativa en pacientes con remodelación intermedia o elevada. Este descubrimiento era similar en las 2 poblaciones de pacientes independientes.

La relación entre la troponina T fosforilada/TnT total y el cambio porcentual de volumen diastólico final (EDV).

Las variables continuas se expresan como media \pm error estándar o como mediana con los percentiles 25° y 75° a menos que se indique otra cosa. Las variables que no seguían una distribución normal se transformaron logarítmicamente antes del ensayo estadístico. Las diferencias de EDV (1 año frente al inicial) se evaluaron mediante el test t de Student emparejado. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante un test t de Student bilateral no emparejado o mediante ANOVA seguida por procedimiento F de Scheffe para comparaciones a posteriori. Los datos categóricos se ensayaron mediante el test de Chi cuadrado o el test exacto de Fischer, según fuera apropiado. La relación entre el cambio porcentual de EDV y la razón de TnT fosforilada en Ser²⁰⁷ con respecto a TnT total se ensayó mediante regresión lineal. Se identificaron correlaciones independientes de cambio de EDV mediante regresión lineal múltiple. Las variables con un valor $p < 0,05$ en análisis univariado se introdujeron en el modelo. La colinealidad se excluyó por medio de una matriz de correlación entre variables predictivas candidatas. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis se llevaron a cabo con el software SAS (versión 9.1, SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos).

Se obtuvieron muestras de sangre para análisis biológicos a 7 ± 3 días después del IM. La expresión de TnT total en la población no difería en los terciles de RVI. La TnT fosforilada en Ser²⁰⁷ y su razón con respecto a la TnT total se redujeron de forma muy significativa en pacientes con remodelación intermedia o elevada.

La relación entre esta razón y el cambio porcentual de EDV entre inicial y 1 año (expresada como una variable continua) se analizó mediante regresión lineal y se descubrió que era estadísticamente significativa ($p = 0,0003$). Análisis multivariable para determinar la correlación independiente de RVI descubrieron tres variables asociadas independientemente con el cambio de EDV: la razón de TnT fosforilada en Ser²⁰⁷ con respecto a TnT total ($p = 0,002$), el índice sistólico de movimiento de la pared ($p = 0,002$) e hipertensión ($p = 0,045$).

	Coficiente β estandarizado	Valor P
Razón de TnT fosforilada en Ser ²⁰⁷ -con respecto a TnT total	-0,308	0,002
Índice sistólico de movimiento de la pared	0,292	0,002
Hipertensión	0,194	0,045
Diabetes mellitus	0,005	0,955

Incremento de troponina T con O-GlcNAcilación en el VI y el plasma de ratas con IC. Mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo específico contra TnT seguida por un análisis por transferencia de Western con anticuerpo para restos de O-GlcNAc, se observó un incremento significativo de O-GlcNAc-TnT en el ventrículo izquierdo de ratas con IC después de 7 días ($p = 0,0023$) y 2 meses ($p = 0,0000004$).

A continuación se investigó si la modulación de O-GlcNAc-TnT también podía detectarse y cuantificarse en el plasma de ratas con IC. También se observó un incremento significativo de O-GlcNAc-TnT en el plasma de ratas con IC después de 7 días ($p = 0,012$) y 2 meses ($p = 0,0004$).

Puede formularse la hipótesis de una interacción entre la O-GlcNAcilación y la fosforilación de Troponina T en ratas con IC.

II. Estudios para pacientes con insuficiencia cardiaca que no sufrieron infarto

El protocolo PTHF. El ProTeomic Heart Failure (PTHF) es un estudio clínico que incluye 30 pacientes que padecen insuficiencia cardiaca grave debido a disfunción sistólica (fracción de expulsión ventricular izquierda $<35\%$) derivados al departamento de cardiología para una evaluación de pronóstico de una cardiomiopatía dilatada no isquémica. El grupo de control se compone de 30 controles seleccionados por el CIC-CRB del CHRU de Lille a partir de una base de voluntarios sanos. Estos controles de la misma edad y sexo que el grupo de pacientes que padecen insuficiencia cardiaca se sometieron a un examen cardiaco y escáner ultrasónico por parte de un investigador de cardiología.

Usando los anticuerpos policlonales específicos y análisis por transferencia de Western, se cuantificó el nivel de troponina T total, troponina T fosforilada en Ser²⁰⁷ y se calculó la razón de troponina T fosforilada en Ser²⁰⁷ con respecto a troponina T total. Los datos obtenidos de los pacientes de control y de caso se muestran a continuación.

5

	Control (n=30)	Caso (n=30)
Troponina T total	2556 ± 223	2583 ± 237
Troponina T fosforilada en Ser ²⁰⁷	10286 ± 485	9547 ± 502

Estos resultados muestran que la troponina T fosforilada puede usarse como biomarcador de remodelación ventricular izquierda pero también de insuficiencia cardiaca (en caso o no de infarto). La troponina T glucosilada también parece ser indicativa de dichos mecanismos y puede usarse para precisar y confirmar los resultados obtenidos con fosforilación de troponina T.

10

Los niveles en **plasma de troponina T-OGlcNAc se incrementan en pacientes de caso del estudio PTHF.**

Se llevó a cabo inmunoprecipitación con 1 µl de plasma mezclado con 1 µg de anticuerpo diluido en tampón RIPA (10 mmol/l de Tris HCL, 150 mol/l de NaCl, IGEPAL® CA-630 al 10% (Sigma-Aldrich) (v/v), desoxicolato sódico al 0,5% (p/v), SDS al 10% (p/v) y ortovanadato sódico al 10% (p/v)). Después de la incubación a 4°C durante una noche en un dispositivo giratorio, se precipitaron complejos inmunes a 4°C durante 1 h en un dispositivo giratorio con nProtein A Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare). Los inmunoprecipitados se lavaron en primer lugar con tampón RIPA, a continuación con tampón RIPA al 90% (v/v), NaCl a 0,5 mol/l, a continuación con tampón RIPA al 50% (v/v), tampón TNE al 50% (v/v) (10 mmol/l de Tris HCl, 150 mmol/l de NaCl, 1 mmol/l de EDTA) y finalmente con tampón TNE antes de la extracción en tampón Laemmli para análisis por transferencia de Western.

15

20

Las proteínas (1 µl de plasma) se separaron mediante SDS-PAGE (gel de acrilamida al 12%) y se transfirieron a una membrana de nirocelulosa Hybond™ de 0,45 µm (GE Healthcare). La carga proteica total se confirmó visualmente mediante tinción con rojo Ponceau de la membrana. Las transferencias se lavaron a continuación en TBS-Tween, se saturaron en leche deshidratada desnatada o BSA al 5% (p/v) en TBS-Tween y se sometieron a inmunotransferencia durante una noche en solución de bloqueo con anticuerpos contra proteínas específicas. Los anticuerpos primarios usados eran restos de O-GlcNAc (anticuerpo para O-GlcNAc monoclonal de ratón, clon CTD110.6, MMS-248R-0500, Covance, para IP). Los anticuerpos secundarios usados para análisis por transferencia de Western eran anticuerpo completo de oveja ECI™ enlazado a peroxidasa de rábano picante anti-IgG de ratón (NA931V, GE Healthcare) y de cabra conjugado a peroxidasa anti-IgM de ratón (A8786, Sigma-Aldrich).

25

30

La especificidad de transferencia de Western de proteínas de O-GlcNAc se controló mediante digestión enzimática. Un µl de plasma se trató con 100 unidades de fosfatasa alcalina (M0290S, New England Biolabs®) diluidas en tampón enzimático o con 15 unidades de β-N-Acetilhexosaminidasa_f (P0721S, New England Biolabs®) diluidas en tampón citrato 100 mM durante 18 horas a 37°C para eliminar todos los residuos fosforilados o de O-GlcNAc.

35

La intensidad de las bandas se cuantificó con software analizador Quantity One® Image (Bio-Rad) según se detalla a continuación: 1) un cuadrado con un tamaño definido se usó para cuantificación de cada banda detectada también para el fondo de la membrana; 2) para cada banda correspondiente a muestras del VI, el valor de fondo se dedujo del valor de intensidad; 3) el valor de intensidad de cada muestra se normalizó con el valor del patrón para eliminar la variación entre transferencias.

40

Las proteínas plasmáticas (1 µl) se inmunoprecipitaron usando anticuerpo específico contra restos de O-GlcNAc y se sometieron a transferencia de Western contra cTnT de pacientes de control (n = 30) y de caso (n=30) del estudio PTHF.

45

	Control (n=30)	Caso (n=30)
Troponina T total	2556 ± 223	2583 ± 237
Troponina T-O-GlcNAc	2838 ± 260	3875 ± 339

Referencias

50

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." *Science*. 2002; 296(5567): 550-3.

Chen CH, Gray MO, Mochly-Rosen D. Cardioprotection from ischemia by a brief exposure to physiological levels of ethanol: role of epsilon protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*. 1999; 96(22): 12784-9.

55

Cieniewski-Bernard, C. et al. Proteomic Analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *J. Proteome Res*. 7, 5004-5016 (2008).

Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R: Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 380: 548-550, 1996.

Cole et al. "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., 1985, págs. 77-96.

- Cote RJ, Morrissey DM, Houghton AN, Beattie EJ, Jr., Oettgen HF, Old LJ: Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 80: 2026-2030, 1983
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate". *The Embo Journal*. 2001; 20(23): 6877-88.
- 5 Hannon GJ. "RNA interference". *Nature*. 2002; 418(6894): 244-51.
- Köhler G, Milstein C. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". *Nature*. 1975; 256(5517): 495-7.
- Latini, R. et al. Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure. *Circulation* 116, 1242-1249 (2007).
- 10 McManus MT, Haines BB, Dillon CP, Whitehurst CE, van Parijs L, Chen J, Sharp PA. "Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes". *Journal of Immunology*. 2002; 169(10): 5754-60.
- Messer, A.E., Jacques, A.M. & Marston SB. Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser23/24 on troponin 1 could account for the contractile defect in end stage heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 247-249 (2007).
- 15 Mulder, P. et al. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation* 96, 1976-1982 (1997).
- Newby, L.K. et al. Value of serial troponin T measure for early and late risk stratification in patients with acute coronary syndrome. The GUSTO-IIa Investigators. *Circulation* 98, 1853-1859 (1998).
- 20 Pfeffer, M.A., Pfeffer, J.M., Steinberg, C. & Finn, P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*. 72, 406-412 (1985).
- Pottiez, G., Sevin, F., Ceccheli, R., Karamanos, Y. & Flahaut C. Actin, gelsolin and filamin-A are dynamic actors in the cytoskeleton remodelling contributing to the blood brain barrier phenotype. *Proteomics* 9, 1207-1219 (2009).
- 25 Savoye, C. et al. Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (from the REmodelage VEntriculaire [REVE] study group). *Am. J. Cardiol.* 98, 144-11149 (2006).
- Tuerk C, Gold L. "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase". *Science*. 1990; 249(4968): 505-10.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro". *Genes & development*, 1999; 13(24): 3191-7.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para detectar una remodelación ventricular izquierda posterior a un infarto en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5
- (i) medir el nivel de troponina T fosforilada en la mezcla de troponinas T en una muestra de sangre obtenida del sujeto,
 - (ii) comparar dicho nivel con un control,
 - (iii) en el que un nivel reducido de troponina T fosforilada en la muestra de sangre es indicativo de una remodelación ventricular izquierda.
- 10

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende, además, las etapas de:

- 15
- (iv) medir el nivel de troponina T glucosilada en la mezcla de troponinas T en dicha muestra,
 - (v) comparar dicho nivel con un control,
 - (vi) en el que un nivel incrementado de troponina T glucosilada en dicha muestra es indicativo de una remodelación ventricular izquierda.

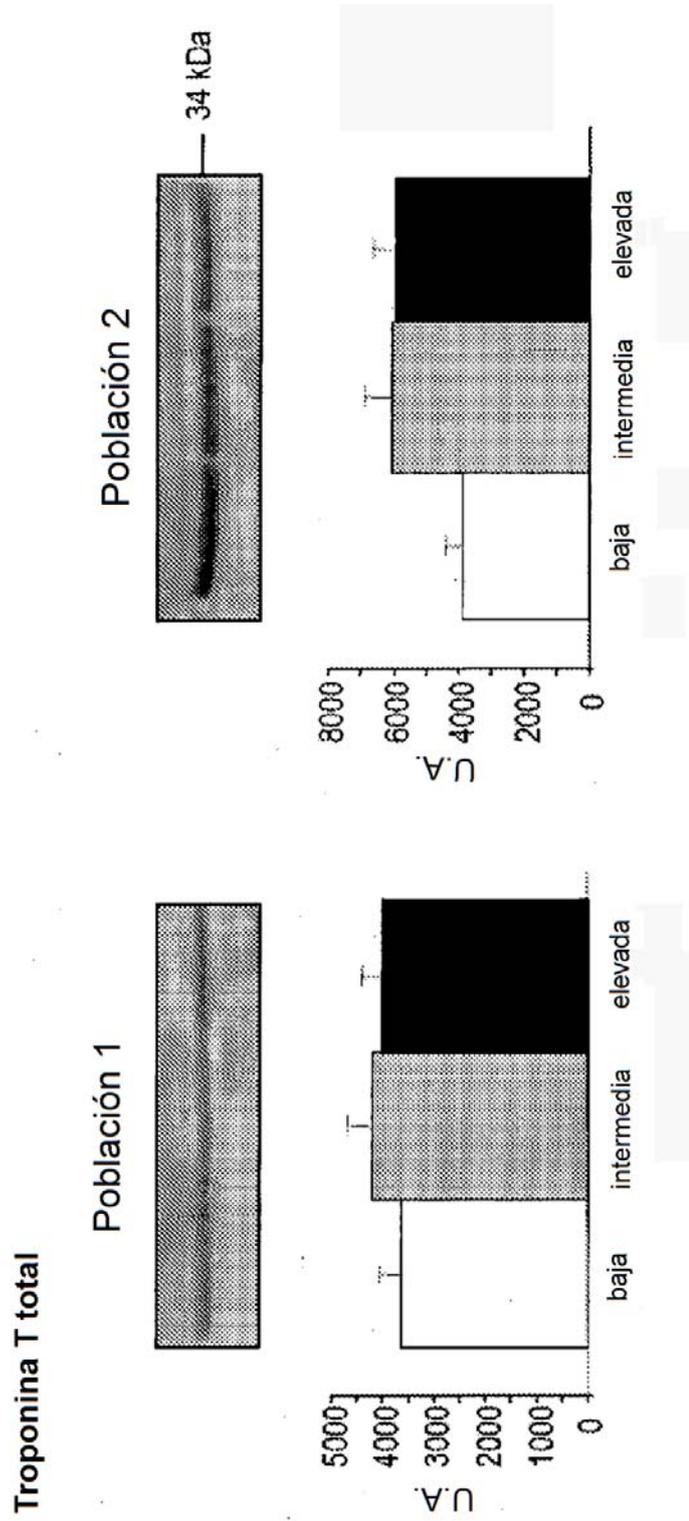


Figura 1A

Troponina fosforilada en Ser²⁰⁷

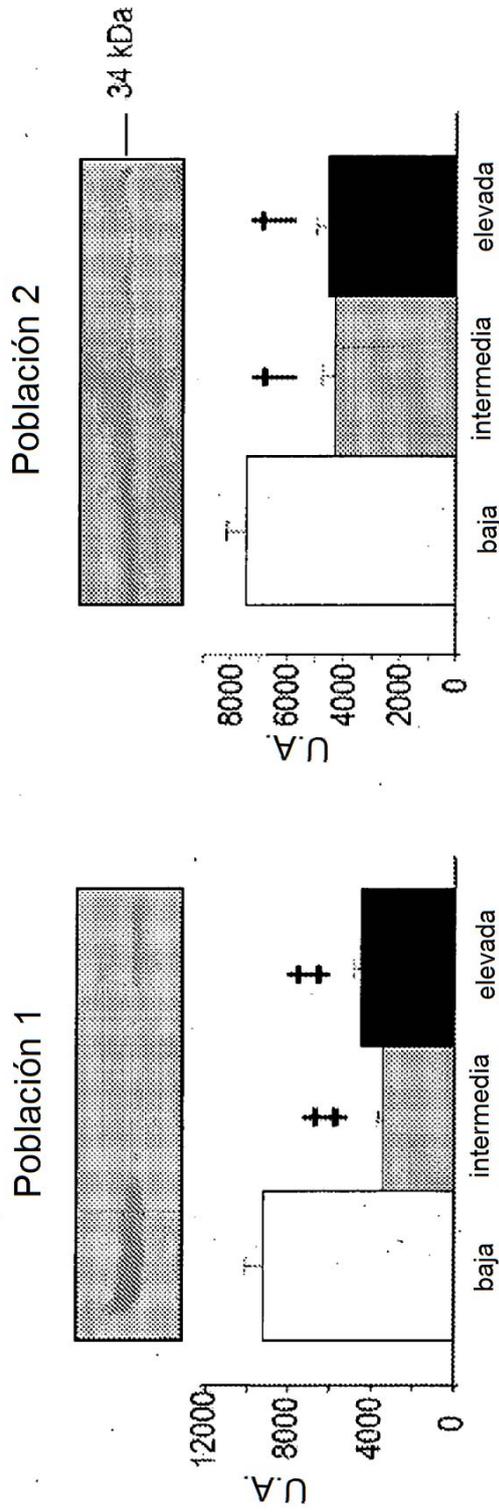


Figura 1B

Razón Troponina fosforilada en Ser²⁰⁷/troponina T total

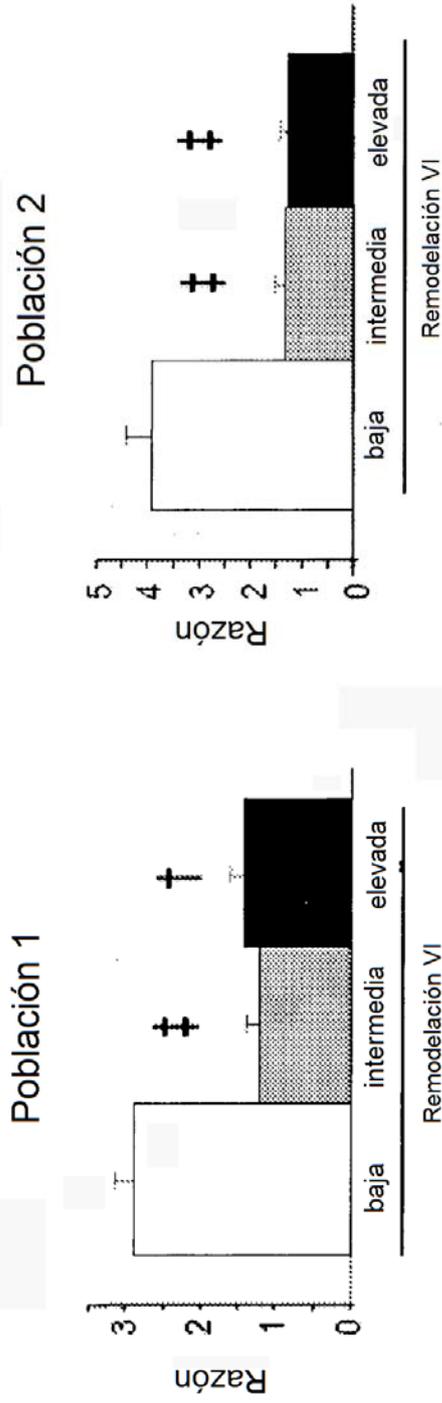


Figura 1C