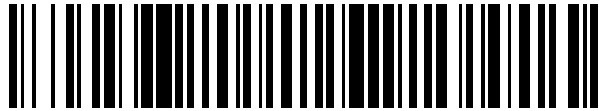


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 512 018**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2010 E 10740528 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2460015**

54 Título: **Utilización de mimecán en la evaluación de la insuficiencia cardiaca**

30 Prioridad:

**27.07.2009 EP 09009666**

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

**23.10.2014**

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:

**BLOCK, DIRK;**

**ARAB, SARA;**

**HESS, GEORG;**

**HUEDIG, HENDRIK;**

**LIU, PETER y**

**WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 512 018 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 mimecán en la evaluación de la insuficiencia cardiaca

**5 Campo de la invención**

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 del marcador mimecán, en el que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa, b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, y evaluar 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 marcadores según se establece en una muestra de control. Se da a conocer además la utilización de mimecán como proteína marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardiaca y de una combinación de marcadores que comprende mimecán.

**15 Antecedentes de la invención**

La insuficiencia cardiaca (IC) es un problema de salud pública importante y creciente. En los Estados Unidos, por ejemplo, aproximadamente 5 millones de pacientes presenta IC y se diagnostican nuevamente más de 550.000 casos de IC cada año (en: American Heart Association, Heart Disease and Stroke Statistics: actualización de 2008, Texas, American Heart Association, 2008). De manera similar, las estadísticas de los Estados Unidos demuestran que la IC es el motivo principal de 12 a 15 millones de consultas y 6,5 millones de días de hospitalización cada año. Entre 1990 y 1999, el número anual de hospitalizaciones se incrementó de aproximadamente 810.000 a más de 1 millón por IC como diagnóstico inicial y de 2,4 a 3,6 millones por IC como diagnóstico inicial o secundario. En 2001, casi 53.000 pacientes murieron de IC como causa principal. La insuficiencia cardiaca es principalmente una condición de las personas de edad avanzada, y de esta manera el ampliamente reconocido "envejecimiento de la población" también contribuye a la creciente incidencia de la IC. La incidencia de la IC es de prácticamente 10 por cada 1.000 habitantes de más de 65 años. Sólo en los Estados Unidos, los costes directos e indirectos estimados de la IC en 2005 fueron de aproximadamente 27.900 millones de dólares estadounidenses y se gastan aproximadamente 2.900 millones de dólares estadounidenses anualmente en fármacos para el tratamiento de la IC (ver las estadísticas de la AHA anteriormente citadas).

**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. Insuficiencia no significa que el corazón ha dejado de bombear, sino que ya no bombea sangre con la eficacia necesaria.

40 Tanto la NYHA [New York Heart Association] como la ACC/AHA [American Association of Cardiology/American Heart Association] han establecido clases funcionales de IC para evaluar la progresión 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 con esfuerzos intensos y las clases III y IV son sintomáticas con esfuerzos leves y en reposo, respectivamente.

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

**Etiología de la IC**

50 Médicamente debe apreciarse que la insuficiencia cardiaca (IC) es una enfermedad compleja. Puede estar causada por la incidencia de un suceso desencadenante, tal como un infarto de miocardio (ataque al corazón) o puede ser secundaria a otras causas, tales como la hipertensión, la diabetes o malformaciones cardiacas, tales como una enfermedad valvular. El infarto de miocardio u otras causas de IC resultan en una caída inicial de la capacidad de bombeo del corazón, por ejemplo al dañarse el músculo cardiaco. Esta caída de la capacidad de bombeo puede no ser inmediatamente detectable, debido a la activación de uno o más mecanismos compensatorios. Sin embargo, se ha observado que la progresión de la IC es independiente del estado hemodinámico del paciente. Por lo tanto, los cambios dañinos causados por la enfermedad se encuentran presentes y continúan mientras el paciente sigue siendo asintomático. De hecho, los mecanismos compensatorios que mantienen una función cardiovascular normal durante las primeras etapas de la IC de hecho pueden contribuir a la progresión de la enfermedad a largo plazo, por ejemplo al ejercer efectos perjudiciales en el corazón y su capacidad de mantener un nivel suficiente de flujo sanguíneo en circulación.

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

5 (i) Entre las terapias dirigidas específicamente a contrarrestar la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal se incluyen los agentes bloqueantes beta-adrenérgicos (B-bloqueantes), los inhibidores del enzima conversor de la angiotensina (ACE), 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 ACE se ha demostrado que prolongan significativamente la vida, al igual que los antagonistas de aldosterona.  
10 Algunos estudios experimentales utilizando agentes bloqueantes de endotelina-1 han demostrado un efecto beneficioso.

15 (ii) La disfunción endotelial sistémica es una característica bien reconocida de la IC y se encuentra claramente presente cuando aparecen los primeros signos de disfunción ventricular izquierda. La disfunción endotelial es importante con respecto a la relación íntima 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 fisiopatología subyacente, la evidencia sugiere que la disfunción endotelial podría estar causada por una relativa falta de NO, que puede atribuirse a un incremento de la formación de O<sub>2</sub> vascular por parte de una oxidasa dependiente de NADH y el posterior exceso de secuestro de NO. Entre los potenciales factores contributivos de una producción incrementada de O<sub>2</sub> se incluyen niveles incrementados de tono simpático, norepinefrina, angiotensina-II, endotelina-1 y TNF-α. Además, los niveles de IL-10, una citoquina antiinflamatoria clave, son inapropiadamente bajos en relación a los niveles de TNF-α. Ahora se cree que los niveles elevados de TNF-α, con citoquinas proinflamatorias asociadas, incluyendo IL-6 y receptores solubles de TNF-α, desempeñan un papel significativo en la evolución de la IC al causar una contractilidad miocárdica reducida, dilatación biventricular e hipotensión, y probablemente participan en la activación y disfunción endoteliales. Se cree además que TNF-α podría desempeñar un papel en la pérdida muscular anteriormente inexplicada que se produce en los pacientes con IC grave. Los estudios preliminares en números pequeños de pacientes sometidos a terapia de receptores solubles de TNF indican mejoras en la clasificación funcional de NYHA y en el bienestar del paciente, medida con los índices de calidad de vida.  
20  
25  
30

35 (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 dentro del miocardio, tales como alteraciones de la forma, masa y volumen ventriculares (Piano M.R. *et al.*, J. Cardiovasc. Nurs. 14:1-23, 2000; Molkentin J.D., Ann. Rev. Physiol. 63:391-426, 2001). Los componentes principales del remodelado miocárdico son alteraciones de la biología de los miocitos, como la hipertrofia de los miocitos, la pérdida de los miocitos por necrosis o apoptosis, alteraciones de la matriz extracelular y alteraciones de la geometría de la cámara ventricular izquierda. No está claro si el remodelado miocárdico es simplemente la respuesta de órgano final que se produce tras años de exposición a los efectos tóxicos de estimulación neurohormonal a largo plazo, o si el remodelado miocárdico contribuye independientemente a la progresión de la insuficiencia cardiaca. La evidencia hasta el momento sugiere que la terapia apropiada puede enlentecer o detener la progresión del remodelado miocárdico.  
40

#### 45 **Marcadores y estado de enfermedad**

Tal como se ha indicado anteriormente, la hipertrofia de los miocitos probablemente representa una de las primeras etapas en la progresión 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 miosina p 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 alteraciones citoesqueléticas (Piano M.R. *et al.*, J. Cardiovasc. Nurs. 14:1-23, 2000; Molkentin J.D., Ann. Rev. Physiol. 63:391-426, 2001).  
50

Los estudios de modelos humanos y animales de la insuficiencia cardiaca sugieren una depresión de la función de los miocitos en los estadios avanzados de la insuficiencia cardiaca. Los mecanismos que subyacen a la disfunción de los miocitos se ha sugerido que implican alteraciones de 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 la insuficiencia cardiaca, la actividad enzimática de calcio-ATPasa del retículo sarcoplásmico se encuentra reducida, mientras que los niveles de tanto ARNm como de proteínas del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> en el sarcolema se encuentran incrementados. Además, se produce un intercambio de isoformas de TnT, una fosforilación reducida de la troponina-I (Tn-I), una actividad de ATPasa de la actomiosina miofibrilar reducida y una formación incrementada de microtúbulos en modelos tanto humanos como animales de insuficiencia cardiaca.  
55  
60

Inicialmente, los cambios en el corazón, que conducen al remodelado miocárdico, están destinados a compensar las partes enfermas del miocardio con el fin de sostener la demanda corporal de oxígeno y nutrientes. Sin embargo, la etapa compensatoria de la insuficiencia cardiaca es limitada y, finalmente, el corazón deficiente es incapaz de mantener una salida cardiaca adecuada para satisfacer las necesidades corporales. De esta manera, se produce una transición de una etapa compensatoria a una etapa descompensatoria. En la etapa descompensatoria, la cascada de cambios en el corazón continúa pero ya no resulta beneficiosa, cayendo el paciente en la progresión de insuficiencia cardiaca a un estado crónico y finalmente a la muerte.

Según la "ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult" [Actualización 2005 de las directrices de la ACC/AHA para el diagnóstico y el control de la insuficiencia cardiaca crónica en el adulto] (S. Hunt *et al.*, [www.acc.org](http://www.acc.org)=las directrices prácticas de la 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. 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 manifiestan signos y síntomas de insuficiencia cardiaca.

### Métodos diagnósticos de la insuficiencia cardiaca

El ensayo diagnóstico individual más útil en la evaluación de los pacientes con IC es el ecocardiograma bidimensional integral acoplado a estudios de flujo Doppler para determinar si existen anomalías del miocardio, las válvulas cardiacas o el pericardio y qué cámaras se encuentran afectadas. Deben estudiarse tres preguntas fundamentales: 1) se encuentra conservada o reducida la FEVI?, 2) la estructura del VI es normal o anormal?, y 3) existen otras anomalías estructurales, tales como anomalías valvulares, pericárdicas o del ventrículo izquierdo que puedan explicar la presentación clínica? Esta información debe cuantificarse 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 la movilidad de la pared regional. Debe evaluarse el tamaño del ventrículo derecho y el rendimiento sistólico. Además debe determinarse semicuantitativamente el tamaño auricular y medirse las dimensiones y/o volúmenes de la aurícula izquierda.

Los datos hemodinámicos no invasivos captados en el momento de la ecocardiografía son un correlato adicional importante para los pacientes con FE conservada o reducida. La cuantificación combinada del patrón del flujo transvalvular mitral, del patrón de flujo venoso pulmonar y de la velocidad anular mitral proporciona datos sobre las características de llenado del VI y la presión auricular izquierda. La evaluación del gradiente regurgitante de la válvula tricúspide acoplada a la medición de la dimensión de la vena cava inferior y su respuesta durante la respiración proporciona una estimación de la presión arterial pulmonar sistólica y de la presión venosa central.

Puede determinarse el volumen eyectado mediante la combinación de la medición de las dimensiones y Doppler pulsado en el tracto de flujo de salida del VI. Sin embargo, pueden encontrarse anomalías en cualquiera de dichos parámetros en ausencia de IC. Ninguna de ellas necesariamente se correlaciona específicamente con la IC; sin embargo, un patrón de llenado totalmente normal argumenta contra la IC clínica.

Desde una perspectiva clínica, la enfermedad es clínicamente asintomática en las etapas compensatorias y descompensatorias tempranas (completamente asintomáticas 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 la ACC/AHA). Los signos externos de la enfermedad (tales como la falta de aliento) no aparecen hasta bien entrada la etapa descompensatoria (es decir, en los estadios C y D según las directrices de la ACC/AHA). El diagnóstico actual se basa en los síntomas externos 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 implicados en la insuficiencia cardiaca. No existen ensayos diagnósticos que reflejen fielmente dichos mecanismos específicos y ayuden al médico a seleccionar el fármaco (y la dosis) adecuada para el paciente correcto (por ejemplo un inhibidor de la ACE, AT II, bloqueantes  $\alpha$ , etc.).

### Diagnóstico previo de la IC con marcadores

La evaluación temprana de los pacientes en riesgo de insuficiencia cardiaca aparentemente resulta posible sólo con marcadores bioquímicos, ya que el individuo en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca en este estadio todavía está libre de síntomas clínicos de IC. En la actualidad no se dispone de marcadores bioquímicos establecidos para la evaluación presintomática fiable de la enfermedad. Actualmente, para cuando se ha establecido un diagnóstico de IC, la enfermedad se encuentra muy avanzada.

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 necesidad**

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

Se justifica una mejora de la evaluación temprana de los individuos en riesgo de insuficiencia cardiaca, es decir, de los individuos clínicamente asintomáticos para insuficiencia cardiaca.

10 La patente EP nº 1 967 853 da a conocer que Nogo-C puede ser utilizado ventajosamente como marcador de la insuficiencia cardiaca.

15 Se ha establecido en los últimos años que los marcadores péptidos natriuréticos de tipo B representan una excelente herramienta para el seguimiento de 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 para muchas otras áreas diagnósticas, no resulta suficiente un único marcador.

20 Mientras que un valor bajo de NT-proBNP presenta un valor predictivo negativo muy elevado para descartar la IC o DVI, 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. A:A37-A38, 2003) se ha observado que se encuentra comprendido en el intervalo de 50% a 60%. De esta manera, un marcador útil para evaluar los individuos en riesgo de insuficiencia cardiaca que por sí mismo presenta, por ejemplo, un valor predictivo positivo elevado de IC, o en combinación con NT-proBNP, y en comparación con NT-proBNP por sí solo, presenta un valor predictivo positivo elevado, resulta de elevada importancia clínica/práctica.

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

30

**Descripción resumida de la invención**

35 Ahora se ha encontrado y establecido que el marcador mimecán puede ayudar en la evaluación de la insuficiencia cardiaca. Puede ayudar a evaluar si un individuo se encuentra en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca. En un aspecto adicional puede ayudar en la evaluación de la progresión de la enfermedad. En otro aspecto, puede ayudar a predecir la aparición de insuficiencia cardiaca. También puede ayudar en la evaluación y selección de un régimen de tratamiento apropiado para prevenir o tratar la insuficiencia cardiaca.

40 Se da a conocer en la presente memoria un método para evaluar la insuficiencia cardiaca en un individuo, que comprende las etapas de medir en una muestra obtenida del individuo la concentración del marcador mimecán, en el que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa, opcionalmente medir en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, y evaluar la insuficiencia cardiaca mediante la comparación de la concentración de mimecán y opcionalmente la concentración o concentraciones de otro u otros marcadores con la concentración de dicho marcador o marcadores según se establece en una muestra de control, en el que una concentración incrementada de mimecán es indicativa de insuficiencia cardiaca.

45 La invención se refiere además a la utilización de la proteína mimecán como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardiaca, en la que la evaluación se realiza *in vitro* a partir de una muestra seleccionada de entre suero, plasma y sangre completa. Se da a conocer además la utilización de una combinación de marcadores que comprende mimecán y otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca en la evaluación de la insuficiencia cardiaca, en el que dicha evaluación se realiza *in vitro* a partir de una muestra seleccionada de entre suero, plasma y sangre completa.

50 Resultarán evidentes aspectos y ventajas adicionales de la presente invención a la luz de la descripción a continuación.

**Descripción detallada de la invención**

60 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 del marcador mimecán, en el que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa, b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia

cardiaca, y c) evaluar 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 marcadores según se establece en una muestra de control, en el que una concentración incrementada de mímecán es indicativa de insuficiencia cardiaca.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes presenta el significado asociado con ellos en la presente sección.

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

15 La expresión "uno o más" se refiere a 1 a 50, preferentemente a 1 a 20, también resultando preferentes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ó 15.

20 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 del paciente. En una realización, son ejemplos de dichas dianas moleculares las proteínas o los polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención se contempla que incluyan fragmentos naturales de dicha proteína, en particular fragmentos detectables inmunológicamente. Los fragmentos detectables inmunológicamente 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 pueden resultar dañadas proteínas que son liberadas por las células o que se encuentran presentes en la matriz extracelular, por ejemplo durante la inflamación, y podrían resultar degradadas o cortadas formando dichos fragmentos. Determinados marcadores son sintetizados en una forma inactiva, que puede activarse posteriormente 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 en una alternativa, un polipéptido marcador puede incluir una modificación post-traducciona. Son ejemplos de modificaciones post-traduccionales, entre otras, la glucosilación, la acilación y/o la fosforilación.

30 La expresión "evaluación de la insuficiencia cardiaca" se utiliza para indicar que el método según la presente invención ayudará al médico a evaluar si un individuo está en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca o ayudará al médico en su evaluación de un paciente de IC en otra u otras áreas de relevancia diagnóstica de la IC. Son áreas preferentes de relevancia diagnóstica en la evaluación de un individuo que presenta 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, la orientación en la selección de un fármaco apropiado, el seguimiento de la respuesta a la terapia y el seguimiento de los pacientes de IC.

40 Un "marcador de insuficiencia cardiaca" en el sentido de la presente invención es un marcador que, en combinación con el marcador mímecán, añade información relevante en la evaluación de la IC a la cuestión diagnóstica que se investiga. La información se considera relevante o de valor adicional si a una especificidad dada, la sensibilidad, o si a una sensibilidad dada, la especificidad, respectivamente, en la evaluación de la IC puede mejorarse mediante la inclusión de dicho marcador en una combinación de marcadores que ya comprende el marcador mímecán. Preferentemente, la mejora de la sensibilidad o especificidad, respectivamente, es 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 marcador péptido natriurético, marcador troponina cardiaca y un marcador de inflamación.

50 El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra biológica obtenida con el propósito de evaluación *in vitro*.

55 La muestra es sangre completa, suero o plasma. Tal como apreciará el experto en la materia, cualquiera de dichas evaluaciones se realiza *in vitro*. Posteriormente se descarta la muestra del paciente. La muestra del paciente únicamente se utiliza 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.

60 La expresión "comparando la concentración... con la concentración tal como se establece en una muestra de control" se utiliza meramente con el fin de ilustrar adicionalmente lo que resulta evidente de todos modos para el experto en la materia. La muestra de control puede ser una muestra de control interna o externa. En un aspecto se utiliza una muestra de control interna, es decir, el nivel o niveles de los marcadores se evalúan en la muestra de ensayo así como en otra u otras muestras obtenidas del mismo sujeto con el fin de determinar si se han producido cualesquiera cambios en el nivel o niveles de dicho marcador o marcadores. En otro aspecto se utiliza una muestra de control externa. Para una muestra de control externa, la presencia o la cantidad de un marcador en una muestra derivada

del individuo se compara con su presencia o cantidad en un individuo que es conocido que sufre, o que es conocido que presenta un riesgo de una condición dada, o un individuo que es conocido que se encuentra libre de una condición dada, es decir, un "individuo normal". Por ejemplo, un nivel de marcador en una muestra del paciente puede compararse con un nivel que es conocido que se asocia a un curso específico de la enfermedad en la IC.

5 Habitualmente el nivel de marcador de la muestra está directa o indirectamente correlacionado con un diagnóstico y el nivel de marcador se utiliza, por ejemplo, para determinar si un individuo se encuentra en 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, el diagnóstico diferencial de insuficiencia cardiaca aguda y crónica, la orientación para la selección de un fármaco adecuado para el tratamiento de la IC, la

10 evaluación del riesgo de 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 un aspecto se obtiene de una población de referencia de edades equivalentes y libre de enfermedades de confusión. Como también resultará evidente para el experto en la materia, los valores absolutos de marcador establecidos en una

15 muestra de control dependerán del ensayo utilizado. Preferentemente, se utilizan muestras de 100 individuos bien caracterizados procedentes de la población de referencia apropiada, para establecer un valor de control (de referencia). También resulta preferente que la población de referencia se seleccione para que consista de 20, 30, 50, 200, 500 ó 1.000 individuos.

20 Los individuos sanos representan una población de referencia preferente para establecer un valor de control.

### Mimecán

25 El mimecán es un proteoglicano de pequeño tamaño con repeticiones ricas en leucina y un precursor que consiste de 298 aminoácidos (ver SEC ID nº 1). Otros nombres del mimecán son OGN, osteoglicina, DKFZp586P2421, OG, OIF y SLRR3A.

30 El mimecán es un elemento de la familia de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) secretados con proteínas nucleares estructuralmente relacionadas. La característica común compartidas por todos los SLRP son las unidades en tándem de repeticiones ricas en leucina (RRL) en la mitad C-terminal de la proteína nuclear. Sin embargo, en la región N-terminal, cada clase de SLRP presenta un dominio único que contiene un grupo de cisteínas con espaciado conservado denominado dominio N de la RRL. Los SLRP de clase III contienen seis carboxil-RRL y entre ellos se incluyen mimecán, epificán y opticina.

35 Algunos estudios funcionales de ratones con inactivación génica para elementos de las clases I y II, tales como decorina, biglicano, lumecán y fibromodulina, han demostrado que los ratones deficientes en SLRP muestran un amplio abanico de defectos atribuibles a una fibrillogénesis del colágeno anormal, sugiriendo que estos SLRP desempeñan funciones importantes en el establecimiento y mantenimiento de la matriz de colágeno (Ameys L. y Young M.F., *Glycobiology* 12:107R-116R, 2002). La deficiencia de mimecán de clase III también provoca

40 anomalías en las fibrillas de colágeno (Tasheva E.S. *et al.*, *Mol. Vis.* 8:407-415, 2002).

45 El mimecán es un componente multifuncional de la matriz extracelular. Se une a una diversidad de otras proteínas (IGF2, IKBKG, IFNB1, INSR, CHUK, IKBKB, NFKBIA, IL15, Cd3, ácido retinoico, APP, TNF, lipopolisacárido, oncogén *c-abl* 1, receptor tirosina quinasa, oncogén *v-crk* del virus CT10 del sarcoma, oncogén vírico *v-src* del sarcoma). Estas diversas actividades de unión podrían explicar la capacidad del mimecán de ejercer diversas funciones en muchos tejidos.

50 Se ha observado mimecán en la córnea, huesos, piel y otros tejidos. Su patrón de expresión se encuentra alterado en diferentes condiciones patológicas. A pesar de la creciente cantidad de datos sobre el papel biológico del mimecán, su función todavía no está clara.

55 Se ha demostrado que el mimecán participa en la regulación de la fibrillogénesis del colágeno, un proceso esencial en el desarrollo, en la reparación de los tejidos y en la metástasis (Tasheva *et al.*, *Mol. Vis.* 8:407-415, 2002). Desempeña un papel en la formación del hueso conjuntamente con TGF-beta-1 ó TGF-beta-2.

Se ha encontrado que el mimecán se expresa constitutivamente en el cristalino del ratón (Tasheva *et al.*, *Molecular Vision* 10:403-416, 2004).

60 Se ha demostrado que el mimecán se encuentra regulado positivamente tras una lesión vascular y tras una irradiación con láser reducida de los osteoblastos, indicando que la proteína correspondiente podría desempeñar un papel en la cicatrización de heridas en las células del músculo liso vascular y en los osteoblastos (Shanahan C.M. *et al.*, *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 17:2434-2447, 1997; Hamajima S. *et al.*, *Lasers Med. Sci.* 18:78-82, 2003).

Además, se ha encontrado que el mimecán se encuentra regulado positivamente en el endotelio activado y que desempeña un papel en la arteroesclerosis (Fernandez B. *et al.*, Mol. Cell. Biochem. 246:3-11, 2003).

5 Los análisis de transcriptomas en tejido cardíaco de rata y humano han revelado una elevada correlación entre el mimecán y la masa del ventrículo izquierdo, así como con el remodelado extracelular en la miocardiopatía dilatada (Petretto E. *et al.*, Nature Genetics 40:546-552, 2008; Barth A.S. *et al.*, J. American College of Cardiology 48:1610-1617, 2006).

10 El documento nº WO 2006/099336 proporciona un perfil integral de la expresión génica de la enfermedad cardíaca isquémica y no isquémica. Uno de entre el gran número de ARNm expresados diferencialmente es el ARNm para el mimecán.

15 El documento nº WO 2009/061382 reivindica la utilización de proteínas secretadas de células madre o miocitos cardíacos en la terapia regenerativa cardíaca y de métodos para el cribado de los pacientes cardíacos para la terapia de células madre. El mimecán es una de entre varias proteínas descritas como útiles en la terapia regenerativa cardíaca.

20 En el área de las enfermedades proliferativas/malignas se ha encontrado que el mimecán se expresa a niveles bajos o no se expresa en absoluto en la mayoría de líneas celulares de cáncer. El descubrimiento proteómico y la validación mediante transferencia western han revelado la regulación negativa del mimecán en el cáncer colorrectal (CRC) en comparación con la mucosa normal (Wang Y. *et al.*, Exp. Biol. Med. 232:1152-1159, 2007).

25 Algunas aplicaciones adicionales se refiere a la utilización terapéutica del mimecán. El documento nº WO 2006/043031 se refiere a la utilización de un agente terapéutico que estimula la actividad de los SLRP de clase III, tal como, por ejemplo, el mimecán, en la prevención y/o el tratamiento del cáncer. El documento nº WO 2004/105784 reivindica la utilización de un agente terapéutico que estimula la actividad de los SLRP de clase III, tal como el mimecán, para la inhibición de la formación de los vasos sanguíneos o de condiciones caracterizadas por una actividad y/o migración excesivas de los monocitos y/o macrófagos.

30 Aparentemente en la técnica anterior la presencia o el nivel de la proteína mimecán en un líquido corporal no se conoce que presente o no se ha sugerido que presente una utilidad diagnóstica en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

35 Los inventores de la presente invención ahora han encontrado y han podido establecer que un valor incrementado del mimecán medido en una muestra de líquido corporal derivada de un individuo es indicativa de insuficiencia cardíaca, en la que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa.

40 Los valores de mimecán 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 en su extremo superior se considera elevado.

En un aspecto se establece un valor de corte fijo. Dicho valor de corte se selecciona para que se corresponda con la cuestión diagnóstica de interés.

45 En un aspecto, se utilizan valores del mimecán medidos en un grupo de control o en una población de control para establecer un intervalo de referencia. En un aspecto preferente, una concentración de mimecán se considera elevada en el caso de que el valor medido sea superior al percentil 90% del intervalo de referencia. En aspectos preferentes adicionales, una concentración de mimecán se considera elevada en el caso de que el valor medido sea superior al percentil 95%, al percentil 96%, al percentil 97% o al percentil 97,5% del intervalo de referencia.

50 En un aspecto, la muestra de control es una muestra de control interna. En dicho aspecto se obtienen muestras en serie del individuo investigado y se comparan los niveles del marcador. Lo anterior puede resultar útil, por ejemplo, para evaluar la eficacia de la terapia.

55 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 indicados en la presente memoria resultan aplicables a enfermedades tanto humanas como veterinarias. Preferentemente, el individuo es un ser humano.

60 Preferentemente, se mide específicamente el marcador mimecán a partir de la muestra mediante la utilización de un agente de unión específico.

Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor del mimecán, una lectina ligante de mimecán o un anticuerpo del mimecán. Un agente de unión específico presenta una afinidad de por lo menos  $10^7$  l/mol para su



molécula diana correspondiente. El agente de unión específico preferentemente presenta una afinidad de  $10^8$  l/mol o todavía 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 moléculas biológicas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para el mimecán. Preferentemente, el nivel de unión a una molécula biológica diferente de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que sólo es 10% o menos, más preferentemente sólo 5% o menos inferior a la afinidad para la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específica preferente satisfará tanto los criterios mínimos anteriormente indicados de afinidad como de especificidad.

Un agente de unión específica preferentemente es un anticuerpo reactivo con el mimecán. 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.

Puede utilizarse cualquier fragmento de anticuerpo que siga cumpliendo los criterios anteriormente indicados de agente de unión específico. Los anticuerpos se generan mediante procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo tal como se describe en Tijssen (Tijssen P., Practice and theory of enzyme immunoassays, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1990, el libro completo, especialmente las páginas 43 a 78). Además, el experto en la materia conoce perfectamente métodos basados en inmunosorbentes que pueden utilizarse para el aislamiento específico de anticuerpos. Mediante estos medios pueden mejorarse la calidad de los anticuerpos policlonales y por tanto su comportamiento en los inmunoensayos (Tijssen P., *supra*, páginas 108 a 115).

Para conseguir lo anteriormente indicado tal como se da a conocer en la presente invención, pueden utilizarse anticuerpos policlonales cultivados en cabras. Sin embargo, claramente también pueden utilizarse anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo de ratas, conejos o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Debido a que pueden producirse anticuerpos monoclonales en cualquier cantidad requerida con propiedades constantes, representan herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica.

La generación y la utilización de anticuerpos monoclonales del mimecán en un método según la presente invención, respectivamente, también se encuentran descritos en la presente memoria.

No resulta fácil purificar el mimecán a partir de una fuente natural. La producción recombinante del mimecán es un método de elección para obtener mayores cantidades de mimecán. En un aspecto preferente se produce mimecán mediante expresión recombinante utilizando un sistema de expresión eucariótico. Son ejemplos de sistemas de expresión eucarióticos la expresión en baculovirus, la expresión en levaduras y la expresión en un sistema de expresión de mamífero. En un aspecto preferente, la expresión del mimecán se lleva a cabo en un sistema de expresión de mamífero. Son ejemplos de sistemas de expresión de mamífero, las células CHO, las células HEK, las células de mieloma, etc. En un aspecto preferente adicional, el mimecán producido recombinantemente se utiliza como antígeno en la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales contra el mimecán. También puede resultar preferible purificar anticuerpos policlonales mediante inmunoadsorción sobre un inmunoadsorbente del mimecán, utilizando un mimecán producido recombinantemente tal como se describe anteriormente en la presente memoria.

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

Para la medición, la muestra obtenida de un individuo se incubaba con un agente de unión específico para el mimecán bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo de agente de unión-mimecán. No resulta necesario especificar dichas condiciones, ya que el experto en la materia podrá identificar fácilmente sin ningún esfuerzo inventivo dichas condiciones apropiadas de incubación. Se mide la cantidad de complejo de agente de unión-mimecán 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 específico-mimecán, todos descritos 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).

Preferentemente se detecta el mimecán en un formato de ensayo de tipo sándwich. En dicho ensayo se utiliza un primer agente de unión específico para capturar el mimecán por una parte y por otra parte se utiliza un segundo agente de unión específico, que se marca para que resulte directa o indirectamente detectable. Preferentemente se utiliza un anticuerpo contra mimecán en un inmunoensayo cualitativo (presencia o ausencia de mimecán) o cuantitativo (se determina la cantidad de mimecán).

- Tal como se describe en detalle en la sección de Ejemplos, se han utilizado dos modelos de ratón para identificar el ARNm y los polipéptidos presentes en el tejido cardíaco de animales experimentales mediante métodos avanzados de micromatrices y proteómica. Sin embargo, estos modelos proporcionan datos por lo menos parcialmente conflictivos y, evidentemente, los datos de tejidos para el ARNm o los polipéptidos respectivos no son representativos de la presencia o ausencia de estos polipéptidos en la circulación. Un marcador que se ha encontrado que se expresa diferencialmente en un modelo puede no expresarse diferencialmente en un segundo modelo o incluso mostrar datos conflictivos en un tercer modelo. Puede encontrarse que el ARNm expresado diferencialmente no se correlacione con niveles incrementados del polipéptido respectivo en la circulación. Aunque una proteína pueda expresarse diferencialmente en los tejidos, esta proteína en la mayoría de casos no presenta ninguna relevancia diagnóstica cuando se mide en un líquido corporal debido a que podría no ser liberada a la circulación, o puede haber sido fragmentada o modificada por ejemplo al ser liberada de una célula o tejido, puede no ser estable en la circulación, puede no ser medible en la circulación, puede no ser específica para una enfermedad dada, etc.
- Los inventores de la presente invención inesperadamente han podido detectar la proteína mimecán en una muestra en la que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa. Todavía más inesperadamente han podido demostrar que la presencia de mimecán en dicha muestra obtenida de un individuo puede estar correlacionada con la IC. No resulta necesaria ninguna muestra de tejido o biopsia para utilizar el marcador mimecán en la evaluación de la IC. La medición de la proteína mimecán se considera muy ventajosa en el campo de la IC.
- La presente invención se refiere a un método para evaluar la insuficiencia cardíaca en un individuo, que comprende las etapas de: a) medir en una muestra obtenida del individuo la concentración del marcador mimecán, en el que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa, b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardíaca seleccionados de entre el grupo que consiste de un marcador péptido natriurético, un marcador troponina cardíaco y un marcador de inflamación, y c) evaluar la insuficiencia cardíaca 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 marcadores según se establece en una muestra de control, en el que una concentración incrementada de mimecán es indicativa de insuficiencia cardíaca.
- En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a la utilización de la proteína mimecán como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo en el que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa.
- El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un único suceso o proceso causaría la enfermedad respectiva, tal como en, por ejemplo, las enfermedades infecciosas. En todos los demás casos un diagnóstico correcto puede resultar muy difícil, especialmente en casos en que la etiología de la enfermedad no se entiende 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 de 100% y simultáneamente una sensibilidad de 100% para una cuestión diagnóstica determinada. Por el contrario se utilizan marcadores bioquímicos para evaluar con una determinada probabilidad o valor predictivo una cuestión diagnóstica subyacente. Al experto en la materia le resultarán totalmente familiares los métodos matemáticos/estadísticos que se utilizan rutinariamente para calcular el riesgo relativo o probabilidad para la cuestión diagnóstica que debe evaluarse. En la práctica clínica rutinaria generalmente el médico considera conjuntamente diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos durante el diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad subyacente.
- Preferentemente, en una realización preferente adicional de la presente invención el método para evaluar la IC se lleva a cabo midiendo la concentración de mimecán y otro u otros marcadores y mediante la utilización de la concentración de mimecán y de otro u otros marcadores en la evaluación de la CC.
- En la evaluación de la IC el marcador mimecán ayudará al médico en uno o más de los aspectos siguientes: a) evaluar el riesgo de un individuo de insuficiencia cardíaca o a evaluar a un paciente que presenta insuficiencia cardíaca, por ejemplo con la intención de identificar el estadio de la insuficiencia cardíaca, para diferenciar entre la insuficiencia cardíaca aguda y crónica, para evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad, para proporcionar una guía de selección de una terapia apropiada, para realizar un seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia, y para 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 cardiaca)**

En la presente memoria se describe también un método *in vitro* para evaluar si un individuo se encuentra en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador mimecán, de medir opcionalmente en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, y de evaluar el riesgo de dicho individuo de desarrollar insuficiencia cardiaca mediante la comparación de la concentración de mimecán y opcionalmente la concentración o concentraciones determinadas para opcionalmente otro u otros marcadores con la concentración de dicho marcador o marcadores con su valor o valores de referencia.

El cribado se refiere a la evaluación no sesgada de los individuos con respecto a su riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca. Mientras que dicho cribado puede llevarse a cabo en teoría con cualquier muestra, en la práctica clínica dicha opción de cribado habitualmente se proporciona a los individuos que de alguna manera se encuentran en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca. Tal como se ha comentado anteriormente, dichos individuos clínicamente pueden ser asintomáticos, es decir, no presentan signos o síntomas de IC. En un aspecto preferente, el cribado para IC se proporciona a los individuos en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca, por ejemplo clasificados dentro del estadio A o B según se define en las directrices prácticas de la ACC/AHA.

Tal como se ha indicado anteriormente, la insuficiencia cardiaca es una de las enfermedades potencialmente letales más prevalentes y costosas en el mundo desarrollado. Debido a su elevada prevalencia y su larga etapa asintomática, la identificación de los individuos en riesgo de desarrollar IC sería de la máxima importancia para la intervención y, en caso posible, para la interrupción del curso de la enfermedad. Sin una evaluación de riesgo muy temprana, la prevención de la progresión de la enfermedad desde el estado asintomático hasta la etapa sintomática de la IC aparentemente es imposible.

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

Otro aspecto preferente descrito en la presente memoria se refiere a la utilización del marcador mimecán en el cribado para insuficiencia cardiaca. Tal como conoce el experto en la materia, la expresión "utilización como marcador" implica que la concentración de una molécula marcadora se cuantificada mediante medios apropiados y que el valor medido de dicho marcador seguidamente se utiliza para indicar, es decir para marcar, la presencia o la ausencia de una enfermedad o condición clínica. Son medios apropiados para la cuantificación, por ejemplo, agentes de unión específicos, por ejemplo anticuerpos.

Preferentemente, el cribado para IC se lleva a cabo en individuos que se sospecha que se encuentran en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca en el futuro. Los pacientes en riesgo de una 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 en individuos que sufren de hipertensión, enfermedad aterosclerótica, diabetes y/o síndrome metabólico.

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

Un aspecto preferente adicional de la presente exposición se refiere a la utilización del mimecán como marcador de una combinación de marcadores de IC con fines de cribado para IC.

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

**Estadificación de los pacientes**

En la presente memoria se describe también un método *in vitro* que ayuda en la estadificación de los pacientes de insuficiencia cardiaca, que comprende las etapas de a) medir en una muestra la concentración del marcador mimecán, de 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 de mimecán determinada en la etapa a) y opcionalmente la concentración o concentraciones determinadas en la etapa b) con la concentración de este marcador o de estos marcadores con su valor o valores de referencia. Preferentemente, el nivel del marcador mimecán se utiliza como ayudar 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 que presentan 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 D según la clasificación de ACA/ACC).

#### 10 **Diferenciación entre un suceso cardiaco agudo y enfermedad cardiaca crónica**

En la presente memoria se describe también un método *in vitro* que ayuda en el diagnóstico diferencial entre un suceso cardiaco agudo y enfermedad cardiaca crónica, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador mimecán, de 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 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 este marcador o de estos marcadores con su valor o valores de referencia.

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

Preferentemente, un "suceso cardiaco agudo" se refiere a una condición, enfermedad o disfunción aguda del corazón, en particular insuficiencia cardiaca aguda, por ejemplo infarto de miocardio (IM) o arritmia. Según el grado de un IM, le puede seguir DVI e insuficiencia cardiaca congestiva (ICC).

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 anteriores, particularmente pequeños (posiblemente seguidos de DVI progresiva). También puede ser un debilitamiento debido a enfermedad inflamatorias, defectos de válvulas cardiacas (por ejemplo defectos de la válvula mitral), cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica, defectos del ritmo cardiaco (arritmias) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. De esta manera, resulta evidente que una enfermedad cardiaca crónica también puede incluir pacientes que han sufrido un síndrome coronario agudo, por ejemplo IM, pero que actualmente no sufren de un suceso cardiaco agudo.

Resulta importante diferenciar entre un suceso cardiaco agudo y enfermedad cardiaca crónica, debido a que un suceso cardiaco agudo y la 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 inmediato para la reperfusión puede ser de importancia primordial. Por el contrario, un tratamiento para la reperfusión realizado en un paciente con insuficiencia cardiaca crónica en el mejor de los casos resulta inútil o levemente perjudicial para este tipo de paciente.

Preferentemente, el marcador mimecán se utiliza en el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardiaca aguda y la insuficiencia cardiaca crónica.

#### 45 **Evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad**

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

En la actualidad resulta muy difícil evaluar o ni siquiera predecir con una probabilidad razonable si un paciente diagnosticado de IC presenta un estado más o menos estable o si la enfermedad progresará y el estado de salud del paciente por consiguiente es probable que se agrave. La gravedad y progresión de la insuficiencia cardiaca habitualmente se establece clínicamente mediante la evaluación de los síntomas clínicos o mediante la identificación de los cambios adversos mediante la utilización de tecnologías de imagen, tales como la ecocardiografía. En un aspecto, el agravamiento de la insuficiencia cardiaca se establece mediante el seguimiento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI). Un deterioro de la FEVI de 5% o más se considera progresión de la enfermedad.

En la presente memoria se describe además la utilización del marcador mimecán 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 de los pacientes que sufren de IC, un nivel elevado de mimecán es un indicador de un riesgo incrementado de progresión de la enfermedad.

5

#### **Guía para la selección de una terapia apropiada para la IC**

En la presente memoria se describe también un método *in vitro* que ayuda en la selección de una terapia de IC apropiada, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador mimecán, de medir opcionalmente en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, y de selección de una terapia apropiada mediante la comparación de la concentración de mimecán y opcionalmente la concentración o concentraciones determinadas para opcionalmente otro u otros marcadores con la concentración de dicho marcador o marcadores con su valor o valores de referencia.

10

Se espera que el marcador mimecán resulte de ayuda para el médico en la selección del régimen de tratamiento más apropiado de entre los diversos regímenes de tratamiento disponibles en el área de la insuficiencia cardiaca. Por lo tanto, un aspecto adicional se refiere a la utilización del marcador mimecán en la selección de un régimen de tratamiento para un paciente que sufre de IC.

15

#### **Seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia**

En la presente memoria se describe también un método *in vitro* para el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia para IC, que comprende las etapas de a) medir en una muestra la concentración del marcador mimecán, de b) medir opcionalmente en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, y realizar un seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia para 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 concentración de este marcador o de estos marcadores con su valor o valores de referencia.

25

Alternativamente, el método anteriormente indicado para el seguimiento de una respuesta del paciente a la terapia puede ponerse en práctica mediante el establecimiento del nivel del marcador mimecán preterapia y post-terapia del mimecán y opcionalmente de otro u otros marcadores y mediante la comparación del nivel o niveles del marcador preterapia y post-terapia.

30

El diagnóstico de la insuficiencia cardiaca está establecido clínicamente. Según la presente exposición, la IC se considera clínicamente establecida en el caso de que el paciente cumpla los criterios de los estadios C o D según definen las directrices prácticas de la ACC/AHA. Según estas directrices, el estadio C se refiere a pacientes con enfermedad cardiaca estructural y con síntomas anteriores o actuales de insuficiencia cardiaca. Los pacientes en el estadio D son aquellos pacientes con insuficiencia cardiaca refractaria que requieren intervenciones especializadas.

35

Tal como se ha indicado en mayor detalle anteriormente, los valores medios para NT-proBNP se encuentran altamente correlacionados con la gravedad de la insuficiencia cardiaca. Sin embargo, tanto BNP como NT-proBNP aparentemente no son ideales para el seguimiento de la respuesta a la terapia de un paciente, ver por ejemplo Beckda-Silva L. *et al.*, Congest. Heart Fail. 11:248-253, 2005, *quiz* 254-255.

40

El marcador mimecán aparentemente resulta apropiada para el seguimiento de la respuesta a la terapia de un paciente. De esta manera, la presente invención se refiere además a la utilización del mimecán en el seguimiento de la respuesta a la terapia de un paciente. En ese área diagnóstica, el marcador mimecán también puede utilizarse para establecer un valor de línea base anterior a la terapia y para medir el mimecán en un punto del tiempo o en varios puntos del tiempo posteriores a la terapia. En el seguimiento de los pacientes de IC, un nivel reducido de mimecán es un indicador positivo de un tratamiento eficaz de la IC.

45

50

#### **Combinación de marcadores**

Los marcadores bioquímicos pueden determinarse individualmente o pueden medirse simultáneamente utilizando una tecnología basada en chips o basada en perlas. Las concentraciones de los marcadores biológicos 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.

55

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

60

Preferentemente, el algoritmo matemático aplicado en la combinación de marcadores es una función logística. El resultado de la aplicación de dicho algoritmo matemático o de dicha función logística preferentemente es un único valor. Según la cuestión diagnóstica subyacente, dicho valor puede correlacionarse fácilmente con, por ejemplo, el riesgo de que un individuo sufra una insuficiencia cardiaca o con otros usos diagnósticos deseados útiles en la evaluación de los pacientes que presentan IC. De un modo preferente, dicha función logística se obtiene mediante a) la clasificación de los individuos en grupos, por ejemplo en normales, individuos en riesgo de insuficiencia cardiaca, pacientes con insuficiencia cardiaca aguda o crónica, etc., b) la identificación de marcadores que difieren significativamente entre estos grupos mediante análisis univariante, c) el análisis de regresión logística para evaluar los valores discriminantes independientes de los marcadores útiles en la evaluación de dichos grupos diferentes, 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 un aspecto preferente, la función logística utilizada para combinar los valores para el mímecán y el valor de por lo menos un marcador adicional se obtienen mediante a) la clasificación de los individuos en los grupos de normales e individuos en riesgo de insuficiencia cardiaca, respectivamente, b) el establecimiento de los valores para el mímecán y el valor de por lo menos un marcador adicional, c) la realización de análisis de regresión logística, y d) la construcción de la función logística para combinar los valores de marcador para el mímecán y el valor de por lo menos un marcador adicional.

Una función logística para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad preferentemente utiliza un algoritmo desarrollado y obtenido mediante la aplicación de métodos estadísticos. Los métodos estadísticos apropiados son, por ejemplo, el análisis discriminante (AD) (es decir, el AD lineal, cuadrático, regularizado), los métodos de núcleo (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (es decir, los clasificadores del vecino k más próximo), CMP (cuadrados mínimos parciales), métodos basados en árboles (es decir, la regresión logística, CART, métodos de bosque aleatorio, métodos de potenciación/empaquetado), modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística), métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica difusa, redes neuronales y métodos basados en algoritmos genéticos. El experto en la materia podrá seleccionar fácilmente un método estadístico apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente exposición 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 de núcleo (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (es decir, los clasificadores del vecino k más próximo), CMP (cuadrados mínimos parciales), los métodos basados en árboles (es decir, la regresión logística, CART, los métodos de bosque aleatorio, los métodos de potenciación) o los modelos lineales generalizados (es decir, la regresión logística). Se encuentran más datos sobre dichos métodos estadísticos 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 ed., 2001.

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

El área bajo la curva de receptor-operador (=ABC) es un indicador del comportamiento o exactitud de un procedimiento diagnóstico. La exactitud de un método diagnóstico se describe mejor mediante 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 de todo el intervalo de datos observados.

El comportamiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica, o de la capacidad de clasificar correctamente los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad del ensayo de distinguir correctamente dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Dichas condiciones son, por ejemplo, la salud y la enfermedad o la progresión de la enfermedad frente a la no progresión de la enfermedad.

En cada caso, el gráfico de CRO ilustra el solapamiento entre las dos distribuciones representando la sensibilidad frente a 1-especificidad para el intervalo completo de umbrales de decisión. En el eje y se encuentra la sensibilidad, o

la fracción positiva verdadera [definida como (número de resultados de ensayo positivos verdaderos)/(número de resultados de ensayo positivos verdaderos + 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 se encuentra la fracción positiva verdadera ó 1-especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de resultados de ensayo negativos verdaderos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de la especificidad y se calcula enteramente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones positivas verdaderas y falsas positivas se calculan de manera totalmente separada, mediante la utilización de los resultados de ensayo de los dos subgrupos diferentes, el gráfico CRO es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto del gráfico CRO representa una pareja de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento entre las dos distribuciones de resultados) presenta un gráfico CRO que pasa por la esquina superior izquierda, en la que la fracción positiva verdadera es 1,0 ó 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción falsa positiva es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados de los dos grupos) es una línea diagonal en 45° desde la esquina inferior izquierda hasta la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se encuentran entre estos dos extremos. (En el caso de que el gráfico CRO se encuentre completamente bajo la diagonal en 45°, se remedia fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor que" a "menor que", o viceversa). Cualitativamente, cuanto más próximo se encuentre el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor será la exactitud global del ensayo.

Una meta conveniente para cuantificar la exactitud diagnóstico de un ensayo de laboratorio es expresar su comportamiento con un único número. La medida global más común es el área bajo el gráfico CRO (ABC). Convencionalmente este 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 diferencias aparentes entre distribución 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 de 90%, sino del gráfico entero. Ésta es una expresión descriptiva cuantitativa de lo próximo que se encuentra el gráfico CRO a un gráfico perfecto (área=1,0).

La sensibilidad de ensayo global dependerá de la especificidad requerida para poner en práctica el método dado a conocer en la presente memoria. En determinados contextos preferentes, una especificidad de 75% puede resultar suficiente, y los métodos estadísticos y los algoritmos resultantes pueden basarse en este requisito de especificidad. En un aspecto 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% o de 95%.

Tal como se ha comentado anteriormente, el marcador mimecán ayuda a evaluar el riesgo individual de desarrollar insuficiencia cardiaca, así como en la evaluación diagnóstica *in vitro* posterior, de que un paciente sufra insuficiencia cardiaca. De acuerdo con lo anterior, un aspecto preferente es la utilización de mimecán como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardiaca.

La utilización de una combinación de marcadores que comprende mimecán 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 un aspecto preferente adicional de la presente exposición. En dicha combinación de marcadores, el otro u otros marcadores preferentemente se seleccionan de entre el grupo que consiste de marcador péptido natriurético, un marcador troponina cardiaco y un marcador de inflamación.

El marcador o marcadores de IC seleccionados preferentes con los que puede combinarse la medición del mimecán preferentemente se seleccionan de entre el grupo que consiste de marcador péptido natriurético, un marcador troponina cardiaco y un marcador de inflamación. Estos otros marcadores preferentes cuyas mediciones se combinan preferentemente con la medición del mimecán o que forman parte de la combinación de marcadores de la IC que comprende mimecán, respectivamente, se comentan en mayor detalle a continuación.

#### **Marcador péptido natriurético**

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

Los marcadores polipéptidos 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.

Los marcadores péptidos natriuréticos preferentes según la presente exposición son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP y fragmentos fisiológicos inmunológicamente detectables de los mismos. Tal como apreciará fácilmente el experto en la materia, el fragmento inmunológicamente detectable debe comprender por lo menos un epítipo,

permitiendo la detección específica de dicho fragmento fisiológico. Un fragmento fisiológico es un fragmento tal como se encuentra naturalmente presente en la circulación de un individuo.

5 Los marcadores en ambas familias de péptidos natriuréticos representan fragmentos de las prohormonas correspondientes, es decir, proANP y proBNP, respectivamente. Debido a que resultan aplicables consideraciones similares a ambas familias, sólo se describirá en cierto detalle la familia del marcador BNP. La prohormona de la familia de BNP, es decir proBNP, consiste de 108 aminoácidos. Se corta proBNP en los 32 aminoácidos C-terminales (77-108), representando la hormona biológicamente activa BNP, y los aminoácidos N-terminales 1 a 76 denominados proBNP N-terminal (o NT-proBNP). BNP, proBNP N-terminal (1-76), así como algunos productos de degradación adicionales (Hunt P.J. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 214:1175-1183, 1995) se encuentran circulando en la sangre. Todavía no se sabe con seguridad si la molécula precursora completa (proBNP 1-108) también se encuentra presente en el plasma. Sin embargo, se ha descrito (Hunt P.J. *et al.*, *Peptides* 18:1475-1481, 1997) que puede detectarse una liberación lenta de proBNP (1-108) en el plasma 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. En el documento nº WO 00/45176 se proporciona una exposición detallada referente a métodos basados en la detección inmunológica de dicha parte central de la molécula de NT-proBNP, y se remite al lector al mismo para más información. Puede resultar adicionalmente ventajoso medir únicamente una determinada subfracción de NT-proBNP, para lo que se ha propuesto el término NT-proBNP nativo. En el documento nº WO 2004/099253 se encuentra una exposición detallada referente a dicha subfracción de NT-proBNP. El experto encontrará todas las instrucciones necesarias en dicho documento. Preferentemente, el NT-proBNP medido es o corresponde a NT-proBNP según se mide con el ensayo Elecsys® de NT-proBNP de Roche Diagnostics, Alemania.

25 La pre-analítica es robusta con NT-proBNP, lo que permite un fácil transporte de la muestra hasta un laboratorio central (Mueller T. *et al.*, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42:942-944, 2004). Pueden almacenarse muestras de sangre a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o transportarse en barco sin que se produzcan pérdidas. En contraste, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C centígrados conduce a una pérdida de la concentración de por lo menos 20% (Mueller T. *et al.*, *supra*; Wu A.H. *et al.*, *Clin. Chem.* 50:867-873, 2004).

35 La familia del péptido natriurético de origen cerebral (especialmente BNP y NT-proBNP) ha sido investigada exhaustivamente en el cribado de determinadas poblaciones de 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 de corazón" (Gremmler B. *et al.*, *Exp. Clin. Cardiol.* 8:91-94, 2003). Estos autores han demostrado que un nivel elevado de NT-proBNP indica la presencia de 'distrés cardiorenal' y que debería motivar la remisión para un examen 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 como para el descarte de la disfunción del ventrículo izquierdo (=DVI) en sujetos con disnea. El papel de los valores negativos de BNP o NT-proBNP en el descarte de la IC o la 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.

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

50 La ANP y la BNP son las hormonas activas y presentan una semivida más corta que sus contrapartidas inactivas respectivas, NT-proANP y NT-proBNP. La BNP es metabolizada en la sangre, mientras que la NT-proBNP circula en la sangre como molécula intacta y como tal se elimina renalmente. La semivida *in vivo* de la NT-proBNP es 120 minutos más larga que la de la BNP, que es de 20 min. (Smith M.W. *et al.*, *J. Endocrinol.* 167:239-246, 2000).

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

60 En la evaluación de un individuo en riesgo de insuficiencia cardiaca el valor medido para el mímecán preferentemente se combina con el valor de NT-proANP y/o de NT-proBNP. Preferentemente, el valor de NT-proBNP se combina con el valor del mímecán. Se aplican consideraciones similares a la selección de una terapia apropiada, a la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad y al seguimiento del curso de la enfermedad.



En el caso de que se utilice el mímecán para evaluar la respuesta de un paciente a la terapia, su medición preferentemente se combina con la medición de la ANP o la BNP.

5 En el caso de que el mímecán se utilice para diferenciar entre la insuficiencia cardiaca aguda y crónica, la combinación preferente de marcadores comprende mímecán, ANP o proANP y BNP o proBNP.

**Marcador troponina cardiaco**

10 La expresión troponina cardiaca se refiere a las isoformas cardiacas troponina I y troponina T. Tal como se ha indicado anteriormente, el término marcador se refiere además a variantes fisiológicas de la molécula marcadora, como fragmentos o complejos fisiológicos. Para los marcadores troponina cardiacos, sus complejos de presencia fisiológica es conocido que son de relevancia diagnóstica y se incluyen expresamente en la presente memoria.

15 La troponina T presenta un peso molecular de aproximadamente 37.000 Da. La isoforma de la troponina T observada en el tejido cardiaco (cTnT) es suficientemente divergente de la TnT del músculo esquelético para permitir la producción de anticuerpos que distinguen entre estas dos isoformas de TnT. TnT es considerado un marcador de 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.

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

30 Las isoformas cardiacas únicas de la troponina I y la troponina T permiten distinguir las inmunológicamente de las otras troponinas del músculo esquelético. Por lo tanto, la liberación a la sangre de la troponina I y la troponina T a partir del músculo cardiaco dañado puede relacionarse específicamente con el daño al tejido cardiaco. Actualmente el experto en la materia también apreciará que las troponinas cardiacas pueden detectarse en la circulación en 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).

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

40 **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.

45 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. La IL-6 es un reactivo de etapa aguda y estimula la síntesis de una diversidad de proteínas, incluyendo moléculas de adhesión. Su función principal es mediar en la producción en la etapa aguda de las proteínas hepáticas, y su síntesis resulta inducida por las citoquinas IL1 y TNF-α. La IL-6 normalmente es producida por macrófagos y linfocitos T. La concentración sérica normal de IL-6 es < 5 pg/ml.

50 La proteína C reactiva (CRP) es una proteína de etapa aguda de unión a Ca<sup>2+</sup> homopentamérica con subunidades de 21 kDa que participa en la defensa del huésped. La síntesis de la CRP resulta inducida por la IL-6 e indirectamente por la IL-1, ya que la IL-1 puede inducir la síntesis de la IL-6 por parte de las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. La concentración plasmática normal de la CRP es <3 mg/ml (30 nM) en el 90% de la población sana y <10 mg/ml (100 nM) en el 99% de los individuos sanos. Las concentraciones plasmáticas de CRP pueden medirse, por ejemplo, mediante ELISA. Predominantemente es sintetizada por el hígado en respuesta a la estimulación por IL-1, IL-6 ó TNF-α y participa en la regulación de la respuesta inmunológica dependiente de las células T. Al producirse sucesos agudos, la concentración de SAA se incrementa hasta 1.000 veces, alcanzando un miligramo por mililitro. Se utiliza para el seguimiento de la inflamación en enfermedades tan diversas como la fibrosis quística, el rechazo del injerto renal, traumatismos o infecciones. En la artritis reumatoide se ha utilizado en determinados casos como sustituto de la CRP, aunque SAA no es tan ampliamente aceptado.

Las proteínas S100 forman una familia constantemente creciente de proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  que actualmente incluye más de 20 elementos. La estructura fisiológicamente relevante de las proteínas S100 es un homodímero, aunque algunos también pueden formar heterodímeros entre sí, por ejemplo S100A8 y S100A9. Las funciones intracelulares van desde la regulación de la fosforilación de las proteínas, las actividades enzimáticas o 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 la apoptosis y la regulación de los procesos inflamatorios. En la inflamación se ha observado S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12, respondiendo S100A8 a la inflamación crónica, mientras que S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se encuentran incrementados en la inflamación aguda. Se ha asociado S100A8, S100A9, S100A8/A9 y S100A12 a diferentes enfermedades con componentes inflamatorios, incluyendo algunos cánceres, el rechazo del aloinjerto renal, la colitis, y más importante, la AR (Burmeister G. y Gallacchi G., *Inflammopharmacology* 3:221-230, 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 el presente aspecto son S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12.

La selectina sE (molécula-1 de adhesión leucocitaria endotelial soluble, ELAM-1) es una glucoproteína transmembranal de tipo I de 115 kDa que se expresa únicamente sobre las células endoteliales y sólo tras la activación por parte de citoquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) o 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 un papel 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 sE en una diversidad de condiciones patológicas (Gearing A.J. y Hemingway I., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 667:324-331, 1992).

En una realización preferente, la presente invención se refiere a la utilización del mimecán como molécula marcadora de la IC en combinación con una o más moléculas marcadoras de la IC en la evaluación de la misma a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo en el que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa.

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

En una realización, la presente invención se refiere a la utilización de una combinación de marcadores que comprende mimecán y otro u otros marcadores de insuficiencia cardíaca seleccionados de entre el grupo que consiste de un marcador péptido natriurético, un marcador troponina cardíaco y un marcador de inflamación en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

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

Un aspecto adicional de la exposición se refiere a la utilización de la combinación de marcadores mimecán y troponina T en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

Un aspecto adicional de la exposición se refiere a la utilización de la combinación de marcadores mimecán y CRP en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

También se describe en la presente memoria una combinación de marcadores que comprende los marcadores mimecán, troponina T, NT-proBNP y CRP.

En la presente memoria se describe además un panel de marcadores utilizado en un método para evaluar la IC *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración del mimecán y otro u otros marcadores de IC y la utilización de las concentraciones determinadas en la evaluación de la IC.

Un panel de marcadores según la presente exposición preferentemente se mide utilizando una técnica de matriz de proteínas. Una matriz es una colección de marcadores individuales ordenados. Dichos marcadores pueden encontrarse espacialmente ordenados, tales como las 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 diferenciadas. Alternativamente, los marcadores pueden localizarse 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 n° 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 un aspecto, los marcadores localizables son antígenos. En otro aspecto, los elementos localizables son autoantígenos. 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 se une específicamente a un anticuerpo. El término autoanticuerpo se encuentra bien definido en la técnica.

En la presente memoria también se describe una matriz de proteínas que comprende el marcador mimecán y opcionalmente otro u otros marcadores de IC.

También se describe en la presente memoria una matriz de proteínas que comprende los marcadores mimecán y NT-proBNP.

También se describe en la presente memoria una matriz de proteínas que comprende los marcadores mimecán y troponina T.

También se describe en la presente memoria una matriz de proteínas que comprende los marcadores mimecán y CRP.

También se describe en la presente memoria una combinación de marcadores que comprende los marcadores mimecán, troponina T, NT-proBNP y CRP.

En la presente memoria también se describe un kit que comprende los reactivos necesarios para medir específicamente mimecán. Se describe además un kit que comprende los reactivos necesarios para medir específicamente mimecán y los reactivos necesarios para medir otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca que se utilizan conjuntamente en una combinación de marcadores de IC.

#### Descripción de las figuras

**Figura 1 Análisis fenotípicos de ratones de tipo salvaje y ratones R9C.** (A) Se generaron curvas de supervivencia para ratones de tipo salvaje (n=79) y ratones R9C (n=44) tras un periodo de 24 semanas. (B) Acortamiento cardiaco evaluado mediante ecocardiografía (=acortamiento fraccionado). Se inicia una alteración funcional significativa en los animales transgénicos R9C incluso transcurridos tan sólo 8 semanas de edad.

**Figura 2 Parámetros ecocardiográficos y hemodinámicos en ratones de tipo salvaje y UA.** (A) Cambios de presión máxima en mmHg a las 2, 4 y 8 semanas de la cirugía. (B) Cambio en el % de fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) a las 2, 4 y 8 semanas de la cirugía. (Los círculos negros indican datos de ratones simuladamente operados y los círculos blancos indican datos de ratones con unión aórtica (UA).

**Figura 3 Valores de mimecán detectados en muestras de IC de la clínica rutinaria y en un panel de control extendido, respectivamente.** Se proporcionan las concentraciones calculadas para el mimecán medida en muestras derivadas de 241 pacientes con insuficiencia cardiaca, marcadas (IC) y en muestras de controles sanos (146 muestras), suero humano normal (SHN) marcado, respectivamente. Los gráficos de caja y bigotes muestran los cuartiles inferior y superior (caja), así como los valores máximo y mínimo (bigotes).

#### Ejemplo 1

##### Modelos de ratón de insuficiencia cardiaca

##### 1.1 Modelo de ratón R9C

Se ha informado de que resulta una cardiomiopatía dilatada humana heredada de la conversión de Arg9 en Cys en el gen del 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 inicia durante la adolescencia, seguida de un deterioro progresivo de la función cardiaca que conduce a una crisis y a la muerte. Un modelo de ratón transgénico de dicha mutación ha mostrado un fenotipo cardiaco similar al de los pacientes afectados y presentaba cardiomiopatía dilatada, contractilidad cardiaca reducida y muerte prematura (Schmitt *et al.*, *supra*, 2003).

Los presentes inventores establecieron una curva de supervivencia para los ratones transgénicos. Los ratones PLN-R9C presentaban una mediana de supervivencia de tan sólo ~20 semanas, persistiendo menos de 15% más de 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 control de tipo salvaje murió durante el periodo de 24 semanas. Se seleccionó ocho

- 5 semanas como el punto temporal representativo de enfermedad de estadio 'temprano' previamente a la primera mortalidad registrada, mientras que se seleccionó 16 semanas como el punto medio entre las 8 y las 24 semanas (DCM clásica). Un análisis detallado de la patología de corazones aislados muestra evidencia de agrandamiento de los ventrículos y las aurículas incluso a las 8 semanas de edad en los ratones PLN-R9C. Las secciones transversales de músculo cardíaco aislado (obtenidas de ratones de tipo salvaje y PLN-R9C seguido de tinción de hematoxilina y eosina también mostraba evidencia de dilatación del ventrículo izquierdo, o adelgazamiento de la pared ventricular, en los animales transgénicos iniciándose desde las 8 semanas, con progresión continua de la dilatación con la edad.
- 10 Se realizaron mediciones cardíacas funcionales mediante ecocardiografía en ratones macho de 8, 16 y 24 semanas de edad (resumidas en la Tabla 1). Las mediciones ecocardiográficas de grosor de las paredes anterior y posterior mostraron que los ratones R9C presentaban dilatación significativa a las 8 semanas, que continuó deteriorándose durante todo el periodo de vida de los ratones. La contractilidad, evaluada por el acortamiento cardíaco (fig. 1B) también se encontraba ligeramente, aunque significativamente, reducido a las 8 semanas, mientras que una reducción más pronunciada era claramente evidente 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 a las 8, 16 y 24 semanas en ratones macho.						
	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
P (lpm)	560±6	567±5	569±5	552±15	565±9	502±15*
PA (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*
PP (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*
DDFVI (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
DSFVI (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*
AF (%)	52,7±0,9	47,6±1,2*	53,1±0,7	32,9±1,9*	52,9±1,5	22,6±2,1
VACc (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*
VAMc (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±3,2	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: P=pulso cardíaco; PA, PP=grosor de pared anterior y posterior (ventrículo izquierdo); DDFVI, DSFVI=dimensión de fin de diástole y de sístole del ventrículo izquierdo, respectivamente; AF=acortamiento fraccionado=(DDFVI-DSFVI)/DDFVIx100%; TEC=tiempo de eyección corregido para P; VACC=velocidad de acortamiento circunferencial corregido para P=AF/TEC; VAMC=velocidad aórtica máxima corregida para P; onda E=onda diastólica transmitral de llenado temprano; PVEDS, PVEDD=presión del final de sístole y de diástole del ventrículo izquierdo; +dP/dt-max=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 GP.

**20 1.2 Modelo de ratón de bandeo aórtico (BA)**

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

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

- 30 Brevemente, se anestesiaron ratones C57BL con ketamina mixta (90 mg/kg) y Rompun (10 mg/kg) y se ligó la aorta utilizando una aguja de calibre 25. Los ratones simuladamente operados se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico, excepto en que la ligación no se apretó contra la aguja.

Puntos temporales experimentales

Con el fin de examinar la respuesta hipertrófica, los animales bandeados y los controles simuladamente operados se sacrificaron a la semana, y a las dos, cuatro y ocho semanas de la intervención. Se evaluó la función cardíaca y el desarrollo de la hipertrofia mediante análisis ecocardiográfico y se confirmó post-mórtem mediante examen de la histología. La Tabla 2 muestra una vista general de la función cardíaca evaluada en los diversos puntos temporales mediante ecocardiografía. Los datos sobre los parámetros ecocardiográficos proporcionados en la Tabla 2 son conocidos por el experto y pueden encontrarse en, por ejemplo, Asahi M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9199-9204, 2004, y Oudit G.Y. *et al.*, Nat. Med. 9:1187-1194, 2003.

5

10

**Tabla 2:**

Parámetro	2 sem. simulado	2 sem. BA	4 sem. simulado	4 sem. BA	8 sem. simulado	8 sem. BA
Tasa cardíaca (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 al final de la sístole (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 al final de la diástole (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 al final de la sístole (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 al final de la diástole (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 de expulsión (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 cardíaco (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*µl)	1339,6 ± 134,0	2196,3 ± 94,6	1577,8 ± 134,4	1477,8 ± 99,6	1451,8 ± 130,4	1179,2 ± 104,1
Elastancia arterial (Ea) (mmHg/µl)	4,8 ± 0,4	6,8 ± 0,3	4,1 ± 0,4	10,1 ± 0,7	4,7 ± 0,4	14,1 ± 1,7
dPdt max (mmHg/s)	5481,6 ± 491,1	6785,3 ± 434,2	6036,0 ± 352,9	5133,2 ± 621,4	5755,8 ± 652,9	6454,4 ± 712,0
dPdt min (mmHg/s)	-5049,6 ± 426,9	-7427,5 ± 685,3	-4743,3 ± 287,7	-5484,75 ± 412,2	-4564,5 ± 525,8	-7625 ± 586,5
dVdt max (µl/s)	883,0 ± 61,2	758,0 ± 29,8	856,5 ± 27,4	1152,8 ± 206,3	1188,0 ± 114,1	1041,2 ± 109,6
dVdt min (µl/s)	-679,6 ± 71,4	-696,3 ± 30,6	-703,5 ± 52,2	-921,0 ± 158,0	-1000,5 ± 76,8	-938,4 ± 126,2
P a dVdt max (mmHg)	9,0 ± 2,5	7,4 ± 2,6	4,6 ± 0,4	10,3 ± 3,4	6,2 ± 1,0	13,3 ± 4,5
P a dPdt max (mmHg)	44,1 ± 2,1	46,3 ± 3,5	49,0 ± 2,6	47,1 ± 2,8	49,6 ± 5,6	52,8 ± 3,6
V a dPdt max (µl)	31,2 ± 2,4	35,5 ± 3,5	35,0 ± 1,1	39,7 ± 1,6	37,0 ± 1,5	47,3 ± 4,4
V a dPdt min (µl)	14,7 ± 2,6	17,1 ± 1,1	15,6 ± 1,9	27,0 ± 1,1	19,2 ± 0,4	39,0 ± 1,1

		3,2		0,7		4,3
<i>Tau_w (ms)</i>	11,4 ± 1,2	8,6 ± 0,7	10,7 ± 0,9	11,2 ± 1,3	11,3 ± 0,5	8,8 ± 0,4
<i>Tau_g (ms)</i>	15,8 ± 1,5	12,1 ± 1,2	17,5 ± 0,7	17,4 ± 1,0	17,5 ± 1,0	15,6 ± 1,0
<i>Potencia máxima (mvatios)</i>	6,4 ± 0,6	9,5 ± 0,4	6,8 ± 0,5	8,8 ± 0,5	7,3 ± 0,7	9,0 ± 0,5
<i>Potencia máxima ajustada a la precarga (mvatios/<math>\mu\text{l}^2</math>)</i>	74,8 ± 16,5	85,0 ± 12,9	55,5 ± 2,4	57,3 ± 7,4	53,6 ± 3,0	46,1 ± 11,5

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

## Ejemplo 2

### Análisis de micromatrices

Se utilizaron preparaciones de tejido crudo para el análisis de micromatrices sin aislamiento posterior de orgánulos. La metodología de análisis de los datos de micromatrices se describe en la literatura (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).

### Preparación de muestras y espectroscopía de masas

#### Homogeneización de corazones y aislamiento de orgánulos

Se aislaron los corazones, se extrajeron las aurículas, los ventrículos se trituraron cuidadosamente con una cuchilla y se enjuagaron extensivamente con PBS (solución salina tamponada con fosfato) helada para eliminar el exceso de sangre. Se homogeneizó el tejido durante 30 s utilizando un homogeneizador manual de vidrio holgado en 10 ml de tampón de lisis (sacarosa 250 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, DTT 1 mM (ditiotreitolo) 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 min; el sobrenadante se utilizó como 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 capas 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 min 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 capas 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. Las mitocondrias se aislaron a partir del sobrenadante mediante recentrifugación a 7.500xg durante 20 min a 4°C; el pellet resultante se lavó dos veces en tampón de lisis. Los microsomas se peletizaron mediante ultracentrifugación del citoplasma postmitocondrial a 100.000xg durante 1 h en un rotor Beckman SW41. El sobrenadante se utilizó como fracción citosólica (=cito).

#### Extracción de orgánulos

Las proteínas mitocondriales solubles se extrajeron mediante incubación de las mitocondrias en tampón de lisis hipotónico (HEPES 10 mM, pH 7,9, DTT 1 mM, PMSF 1 mM), durante 30 min sobre hielo. La suspensión se sonicó brevemente y se eliminaron los residuos mediante centrifugación a 13.000xg durante 30 min. El sobrenadante se utilizó como la fracción "mito 1". El pellet insoluble resultante se resuspendió en tampón de extracción de membranas de detergente (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 min, seguido de centrifugación a 13.000xg durante 30 min; el sobrenadante se utilizó como fracción "mito 2".

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

## Digestión de extractos de orgánulos y análisis MudPIT

Una alícuota de aproximadamente 100 µg de proteínas totales (determinadas mediante ensayo de Bradford) de cada fracción se precipitó durante la noche con 5 vol de acetona helada, a aproximadamente 20°C, seguido de centrifugación a 13.000xg durante 15 min. 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 carboxiamidometilación con yodoacetamida 5 mM durante 1 h a 37°C en la oscuridad. A continuación, las muestras se diluyeron con urea 4 M con un volumen 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 con urea 2 M con un volumen 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, Canadá) a 30°C bajo agitación. 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 MudPIT multiciclo de 12 etapas de 20 h de duración totalmente automático tal como se ha descrito anteriormente (Kislinger T. *et al.*, Mol. Cell Proteom. 2:96-106, 2003). Brevemente, se conectó una bomba cuaternaria de HPLC con un espectrómetro de masas con trampa de iones LCQ DECA XP (ThermoFinnigan, San Jose, CA). Se estiró una microcolumna capilar de sílice fundido de 100 pm de d.i. (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) hasta una punta fina utilizando un estirador láser P-2000 (Sutter Instruments, Novato, CA) y se empaquetó con 8 cm de resina Zorbax Eclipse XDB-C18 de 5 µm (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canadá), seguido de 6 cm de resina de intercambio catiónico fuerte Partisphere de 5 µm (Whatman, Clifton, N.J.). Se cargaron manualmente muestras individuales en columnas separadas utilizando un recipiente presurizado. Las condiciones del solvente en la cromatografía eran exactamente las indicadas en Kislinger T. *et al.*, Mol. Cell Proteom. 2:96-106, 2003.

## Identificación y validación de proteínas

Se utilizó el algoritmo de búsqueda en la base de datos SEQUEST para hacer corresponder los espectros de masas en tándem de péptidos con las secuencias peptídicas en una base de datos formateada FASTA mínimamente redundante mantenida localmente que incluía secuencias de proteínas de ratón y humanas obtenidas de las bases de datos Swiss-Prot/TrEMBL e IPI. Con el fin de evaluar estadísticamente la tasa empírica de falso descubrimiento para controlar y, por lo tanto, minimizar las identificaciones falsas positivas, se realizó una búsqueda en todos los espectros frente a las secuencias de las proteínas en las orientaciones de aminoácidos tanto normal (directa) como invertida (inversa) (Kislinger T. *et al.*, Mol. Cell Proteom. 2:96-106, 2003). El algoritmo de filtración STATQUEST seguidamente se aplicó 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 ≤15, correspondiente a una probabilidad de 85% o superior de ser una correspondencia correcta). Las correspondencias de alta confianza se dividen 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 escaneo) para múltiples péptidos correspondientes a una proteína dada, conjuntamente con información referente al nombre de muestra, número de experimento, etapa de MudPIT, fuente de los orgánulos, secuencia de aminoácidos, masa molecular, punto isoeléctrico, carga y nivel de confianza. Sólo aquellas proteínas con un valor predicho de p de confianza de 95% o superior, y para el que se hayan detectado colectivamente por lo menos dos espectros, se conservan para un análisis posterior.

## Ejemplo 3

### Evaluación estadística de los datos obtenidos en los sistemas modelo

#### 3.1 Métodos estadísticos utilizados para generar 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 subgrupos de proteínas, se someten a normalización global que en primer lugar separa los datos en cada serie en un número igual de grupos, fijado en 100 para el análisis de los presentes inventores, basándose en sus recuentos espectrales. A continuación, se lleva a cabo LOESS (Cleveland W.S. y Devlin S.J., Journal of the American Statistical Association 83:596-610, 1988) en cada grupo (1-100), ajustando para las diferencias en los recuentos espectrales en un juego de genes con recuentos espectrales similares.

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

se describía utilizando:

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

5 El segundo modelo utilizaba únicamente el tiempo (8S, 16S, final) y la localización (cito, micro, mitol, mitoll) como factores y se describía utilizando:

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

10 en el que  $\beta_0$  es el término de corte y  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$  son las estimaciones de las pendientes para las variables tiempo, tiempo al cuadrado, localización y control/enfermedad.

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

20 Con el fin de considerar el análisis de múltiples hipótesis a partir del modelo anteriormente indicado, los valores de p se corrigieron utilizando una corrección por tasa de falso descubrimiento (TFD), concretamente la corrección TFD de Benjamini-Hochberg (Benjamini Y. y Hochberg Y., Journal of the Royal Statistical Society B. 57:289-300, 1995). Lo anterior generó un grupo de 40 proteínas con valores de p corregidos  $< 0,05$  para el modelo de ratón R9C.

### 25 **3.2 Métodos estadísticos utilizados para generar valores de p de expresión diferencial para el modelo de ratón de bandeó aórtico**

30 A partir de las 68 series experimentales en el modelo de ratón de bandeó aórtico se identificaron 3.152 proteínas con recuentos espectrales. Se aplicó el mismo análisis de los datos a las tablas de datos del modelo de ratón de bandeó aórtico tal como se ha indicado anteriormente para el modelo de ratón R9C.

#### **Ejemplo 4**

### 35 **4.1 ELISA para la medición del mimecán en muestras de suero y plasma humano**

40 Para la detección del mimecán en suero o plasma humano se desarrollo un ELISA de tipo sándwich. Para la captura y detección del antígeno se conjugaron alícuotas del anticuerpo policlonal anti-mimecán de R&D Systems (número de catálogo AF 2660) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

45 Se incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina, con 100 ml de anticuerpo policlonal anti-mimecán biotinilado, durante 60 min a una concentración de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  en solución 1xPBS. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%, se bloquearon con PBS + BSA al 2% (albúmina de suero bovino) durante 45 min 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 100 ml de una dilución en serie del mimecán recombinante como antígeno estándar o con muestras diluidas de suero o plasma (1:5 en 1x PBS + BSA al 1%) de pacientes o individuos de control, respectivamente. Tras la unión del mimecán, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%. Para la detección específica del mimecán unido, los pocillos se incubaron con 100 ml de anticuerpo policlonal anti-mimecán digoxigenilado durante 45 min a una concentración de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  en 1x PBS + BSA al 1%. A continuación, las placas se lavaron tres veces para eliminar el anticuerpo no unido. En la etapa siguiente, los pocillos se incubaron con 100  $\mu\text{l}$  de 75 mU/ml de conjugados de anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 1633716) durante 30 min en 1x PBS + BSA al 1%. A continuación, las placas se lavaron seis veces con el mismo tampón de lavado utilizado anteriormente. Para la detección de los complejos de antígeno-anticuerpo, los pocillos se incubaron con 100 ml de solución ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11685767) y se midió la densidad óptica (DO) tras 15 min a 405 y 492 nm con un lector ELISA.

### 50 **4.2 ELISA de mimecán con sueros de pacientes que presentan IC y han sido obtenidos de la clínica rutinaria y donantes aparentemente sanos, respectivamente**

60



Con el fin de evaluar adicionalmente la utilidad del ensayo de mimecán bajo condiciones clínicas rutinarias, se investigó un panel de sueros procedentes de pacientes de IC (n=241) y de 146 sueros de pacientes de control aparentemente sanos. Tal como se ha mencionado anteriormente, los sueros se diluyeron 1:5 en 1xPBS + BSA al 1%. La Tabla 3 muestra el resultados de estos paneles extendidos:

5

**Tabla 3: Resultados del ELISA de mimecán (panel con muestras de IC procedentes de la clínica rutinaria)**

Muestras de IC Id de muestra	ELISA de mimecán [ng/ml]	Muestras de NHS Id de muestra	ELISA de mimecán [ng/ml]
4143	14,31	1	7,61
4144	28,36	2	0,95
4145	11,41	3	4,91
4146	20,76	4	10,29
4150	48,10	5	0,00
4151	32,78	6	16,90
4152	51,59	7	3,18
4153	31,65	8	3,04
4154	38,64	9	5,38
4155	26,56	10	0,00
4157	70,99	11	2,39
4158	46,94	12	6,01
4159	43,53	13	45,45
4161	33,28	14	15,42
4162	27,75	15	23,78
4163	4,77	16	4,91
4164	40,47	17	8,60
4170	85,11	18	10,97
4171	64,11	19	0,00
4173	37,36	20	22,98
4174	43,93	21	6,25
4175	19,53	22	13,34
4176	33,49	23	4,68
4178	18,03	24	1,62
4181	27,09	25	3,85
4182	33,99	26	22,18
4187	67,39	27	0,00
4189	61,88	28	2,39
4190	7,31	29	0,00
4191	32,85	30	12,63
4192	6,54	31	14,42
4193	38,26	32	14,42
4194	21,00	33	8,35
4196	16,03	44	20,20
4198	34,93	45	8,25
4199	44,17	46	9,95
4200	19,11	47	5,47
4202	54,94	48	11,19
4203	28,02	49	12,18
4204	12,46	50	9,20
4205	37,89	51	13,57
4206	22,75	52	11,57
4212	17,02	53	7,67
4213	48,52	54	9,68
4588	28,42	55	4,47
4589	30,11	56	14,82
4590	49,04	57	12,01
4591	4,99	58	13,29
4594	14,33	59	16,03
4595	20,23	60	14,36

ES 2 512 018 T3

4597	21,59	61	12,12
4606	40,07	62	14,82
4607	36,73	63	12,84
4608	66,99	64	9,46
4613	14,15	65	10,65
4622	60,70	66	15,97
4623	45,94	67	17,44
4624	47,91	68	11,85
4625	64,02	69	13,85
4633	55,99	70	15,34
4640	49,54	71	11,74
4641	21,89	72	12,68
4643	52,86	73	25,57
4676	9,02	74	12,84
4677	70,46	75	13,52
4678	23,38	76	68,96
4680	61,66	77	54,79
4681	23,88	78	121,01
4684	35,94	79	100,57
4685	27,89	80	69,22
4687	27,68	81	104,15
4688	28,94	82	123,01
4690	0,00	83	62,39
4691	35,49	84	63,96
4692	45,69	85	70,54
4693	37,07	86	7,55
4694	15,60	87	113,07
4695	45,20	88	97,02
4696	40,54	89	84,33
4697	19,07	90	64,49
4698	16,90	91	81,66
4699	43,63	92	90,51
4700	19,26	93	136,42
4701	14,33	94	85,67
4702	55,46	95	65,80
4703	9,61	96	113,35
4704	42,79	97	73,44
4705	14,24	98	107,48
4706	48,04	99	96,74
4707	39,72	100	76,08
4708	46,18	101	104,98
4711	32,93	102	100,30
4712	16,52	103	56,36
4713	48,04	104	85,40
4714	131,71	105	79,26
4715	189,20	106	37,11
4717	168,44	107	36,68
4720	102,50	108	26,45
4726	138,80	109	32,07
4728	262,50	110	42,87
4729	117,30	111	39,52
4730	262,50	112	41,97
4732	89,97	113	35,59
4736	161,13	114	36,57
4737	172,31	115	33,55
4738	166,84	116	79,89
4739	163,03	117	43,09
4790	221,41	118	31,22
4795	156,13	119	81,28

ES 2 512 018 T3

4799	129,66	120	38,20
4805	125,89	121	25,84
4806	80,33	122	16,71
4807	82,19	123	25,63
4808	183,82	124	28,30
4811	132,30	125	24,22
4813	193,98	126	32,49

Muestras de IC	ELISA de mimecán [ng/ml]	Muestras de NHS	ELISA de mimecán [ng/ml]
ID de muestra		ID de muestra	
4815	136,13	127	27,27
4819	233,07	128	22,21
4820	102,50	129	31,33
4821	54,01	130	32,70
4822	175,24	131	32,92
4823	132,59	132	32,07
4827	88,62	133	42,64
4830	206,90	134	27,48
4831	207,61	135	33,34
4832	182,82	136	46,69
4836	206,19	137	41,80
4837	52,96	138	53,64
4838	262,50	139	60,42
4843	104,70	140	42,68
4845	65,28	141	67,32
4846	262,50	142	49,39
4847	108,59	143	57,63
4849	180,50	144	72,42
4850	140,59	145	51,05
4851	210,12	146	46,99
4853	118,44	147	73,86
4855	262,50	148	16,00
4857	200,21	149	56,40
4858	213,36	150	89,41
4860	137,90	151	54,10
4862	110,82	152	64,95
4867	58,46	153	54,40
4868	262,50	154	60,89
4869	14,31	155	30,98
4871	36,89	156	41,50
4872	19,34	n	146
4873	26,96		

Muestras de IC	ELISA de mimecán [ng/ml]	Muestras de NHS	ELISA de mimecán [ng/ml]
ID de muestra		ID de muestra	
4878	46,97		
4879	79,62		
4880	60,00		
4881	54,38		
4882	64,39		
4886	37,44		
4889	86,50		
4893	18,65		
4894	24,32		
4895	67,86		
4896	53,90		
4900	61,99		

4902	93,64
4904	53,42
4905	44,11
4906	33,88
4907	56,44
4911	29,86
4912	27,89
4913	52,83
4914	35,27
4916	47,78
4917	72,58
4928	44,11

Muestras de IC ID de muestra	ELISA de mimecán [ng/ml]	Muestras de NHS ID de muestra	ELISA de mimecán [ng/ml]
4929	51,29		
4930	52,47		
4937	67,86		
4940	36,03		
4941	66,57		
4942	73,51		
4943	26,76		
4944	34,52		
4945	93,34		
4948	37,66		
4949	47,89		
4950	42,53		
4952	78,38		
4953	68,50		
4954	86,21		
4955	69,29		
4956	86,50		
4957	98,30		
4961	15,17		
4965	82,12		
4967	33,02		
4968	79,37		
4971	46,84		
4974	99,84		
4975	102,74		
4976	137,16		
4977	42,68		
4978	24,85		
4979	142,83		
4981	80,02		
4982	89,24		
4983	91,08		
4986	75,64		
4995	81,82		
4996	156,76		
4997	63,85		
5004	210,31		

Muestras de IC ID de muestra	ELISA de mimecán [ng/ml]	Muestras de NHS ID de muestra	ELISA de mimecán [ng/ml]
5005	45,35		
5008	64,95		
5009	40,77		
5010	45,20		
5011	262,5		
5012	141,91		
5020	92,75		
5021	262,5		
5022	36,55		
5023	105,14		
5026	98,65		
5030	46,69		
5031	91,08		
5034	65,11		
5035	76,28		
5036	96,79		
5042	71,94		
5043	92,08		
5044	50,15		
5045	96,28		
5046	108,42		
5048	81,98		
5049	184,18		
5050	119,77		
5055	52,42		
5056	95,44		
5057	92,42		
5058	64,01		
5063	107,03		
5064	60,57		
5065	129,75		
n	241		

5 Los datos resumidos en la Tabla 3 también se utilizaron para calcular los gráficos de caja mostrados en la figura 3. La figura 3 demuestra que existe una diferencia considerada entre los valores medios de mimecán medidos en sueros derivados de pacientes con insuficiencia cardiaca y los medidos en sueros derivados de individuos de control aparentemente sanos. Un valor incrementado de mimecán es indicativo de insuficiencia cardiaca.

**Ejemplo 5**

10 **Combinaciones de marcadores que comprenden el marcador mimecán en la evaluación de la insuficiencia cardiaca**

**Ejemplo 5.1 La combinación de marcadores NT-proBNP y mimecán**

15 La combinación de marcadores NT-proBNP y mimecán se evaluó para la diferenciación de los pacientes en el estadio B y estadios C más D, respectivamente. Se evaluó la exactitud diagnóstica mediante el análisis de muestras líquidas individuales obtenidas de grupos bien caracterizados de individuos, es decir, 50 individuos en el estadio B según los criterios de la ACA/ACC de clasificación de la IC y 50 pacientes que sufrían de IC y que presentaban el estadio C según los criterios de la ACA/AC de clasificación de la IC. La NT-proBNP medida mediante 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 mimecán medido tal como se ha indicado anteriormente se cuantificaron en una muestra de suero obtenida de cada uno de dichos individuos. El análisis ROC se llevó a cabo según Zweig M.H. y Campbell G., *supra*. El poder discriminante para diferenciar los pacientes en el estadio C de los individuos en el estadio B para la combinación de mimecán y el marcador establecido NT-proBNP se calculó mediante análisis

20

discriminante regularizado (Friedman J.H., Regularized Discriminant Analysis, Journal of the American Statistical Association 84:165-175, 1989).

**Ejemplo 5.2 La combinación de marcadores troponina T y mimecán**

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

**Ejemplo 5.3 La combinación de marcadores mimecán y CRP**

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

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG University of Toronto
- <120> Utilización de mimecán en la evaluación de la insuficiencia cardíaca
- <130> 26218 WO
- 40 <150> EP09009666.0
- <151> 2009-07-27
- <160> 1
- 45 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 298
- 50 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 512 018 T3

Met Lys Thr Leu Gln Ser Thr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Pro Leu  
 1 5 10 15

Ile Lys Pro Ala Pro Pro Thr Gln Gln Asp Ser Arg Ile Ile Tyr Asp  
 20 25 30

Tyr Gly Thr Asp Asn Phe Glu Glu Ser Ile Phe Ser Gln Asp Tyr Glu  
 35 40 45

Asp Lys Tyr Leu Asp Gly Lys Asn Ile Lys Glu Lys Glu Thr Val Ile  
 50 55 60

Ile Pro Asn Glu Lys Ser Leu Gln Leu Gln Lys Asp Glu Ala Ile Thr  
 65 70 75 80

Pro Leu Pro Pro Lys Lys Glu Asn Asp Glu Met Pro Thr Cys Leu Leu  
 85 90 95

Cys Val Cys Leu Ser Gly Ser Val Tyr Cys Glu Glu Val Asp Ile Asp  
 100 105 110

Ala Val Pro Pro Leu Pro Lys Glu Ser Ala Tyr Leu Tyr Ala Arg Phe  
 115 120 125

Asn Lys Ile Lys Lys Leu Thr Ala Lys Asp Phe Ala Asp Ile Pro Asn  
 130 135 140

ES 2 512 018 T3

Leu Arg Arg Leu Asp Phe Thr Gly Asn Leu Ile Glu Asp Ile Glu Asp  
 145 150 155 160

Gly Thr Phe Ser Lys Leu Ser Leu Leu Glu Glu Leu Ser Leu Ala Glu  
 165 170 175

Asn Gln Leu Leu Lys Leu Pro Val Leu Pro Pro Lys Leu Thr Leu Phe  
 180 185 190

Asn Ala Lys Tyr Asn Lys Ile Lys Ser Arg Gly Ile Lys Ala Asn Ala  
 195 200 205

Phe Lys Lys Leu Asn Asn Leu Thr Phe Leu Tyr Leu Asp His Asn Ala  
 210 215 220

Leu Glu Ser Val Pro Leu Asn Leu Pro Glu Ser Leu Arg Val Ile His  
 225 230 235 240

Leu Gln Phe Asn Asn Ile Ala Ser Ile Thr Asp Asp Thr Phe Cys Lys  
 245 250 255

Ala Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Arg Asp Arg Ile Glu Glu Ile Arg Leu  
 260 265 270

Glu Gly Asn Pro Ile Val Leu Gly Lys His Pro Asn Ser Phe Ile Cys  
 275 280 285

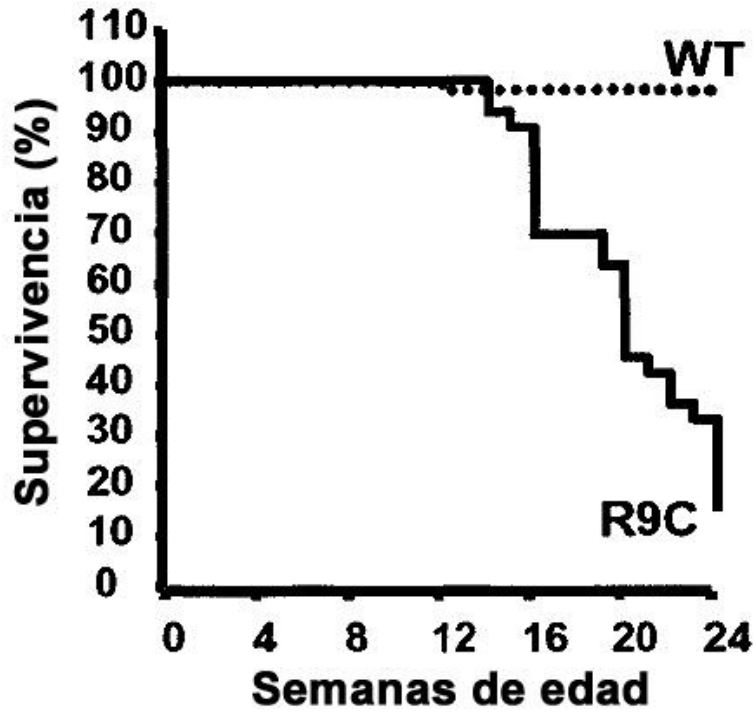
Leu Lys Arg Leu Pro Ile Gly Ser Tyr Phe  
 290 295



**REIVINDICACIONES**

1. Método para evaluar la insuficiencia cardiaca *in vitro* en un individuo, que comprende las etapas de:
- 5 a) medir en una muestra obtenida del individuo, la concentración del marcador mimecán, en la que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa,
- b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca, seleccionados de entre el grupo que consiste de un marcador péptido natriurético, un marcador troponina cardiaca y un marcador de inflamación seleccionado de entre interleuquina-6, proteína C reactiva, amiloide sérico A y una proteína S100, y
- 10 c) evaluar la insuficiencia cardiaca mediante la comparación de la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la concentración o concentraciones en la etapa (b) con la concentración de dicho marcador o dichos marcadores establecidos en una muestra de control, en la que una concentración incrementada de mimecán es indicativa de insuficiencia cardiaca.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado además porque dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de suero y plasma.
3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado además porque dicho otro u otros marcadores es NT-proBNP.
- 20 4. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado además porque dicho otro u otros marcadores es troponina T.
5. Método según la reivindicación 1, en el que el marcador mimecán se mide en una muestra obtenida de un individuo en riesgo de insuficiencia cardiaca.
- 25 6. Utilización de la proteína mimecán como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardiaca, en la que dicha evaluación se realiza *in vitro* a partir de una muestra seleccionada de entre suero, plasma y sangre completa.
- 30 7. Utilización de una combinación de marcadores que comprende mimecán y otro u otros marcadores de insuficiencia cardiaca seleccionada de entre el grupo que consiste de un marcador péptido natriurético, un marcador troponina cardiaca y un marcador de inflamación seleccionado de entre interleuquina-6, proteína C reactiva, amiloide sérico A y una proteína S100, en la evaluación de la insuficiencia cardiaca, en la que dicha evaluación se realiza *in vitro* a partir de una muestra seleccionada de entre suero, plasma y sangre completa.
- 35 8. Utilización de una combinación de marcadores según la reivindicación 6, que comprende por lo menos mimecán y NT-proBNP.
- 40

**Fig. 1A**



**Fig. 1B**

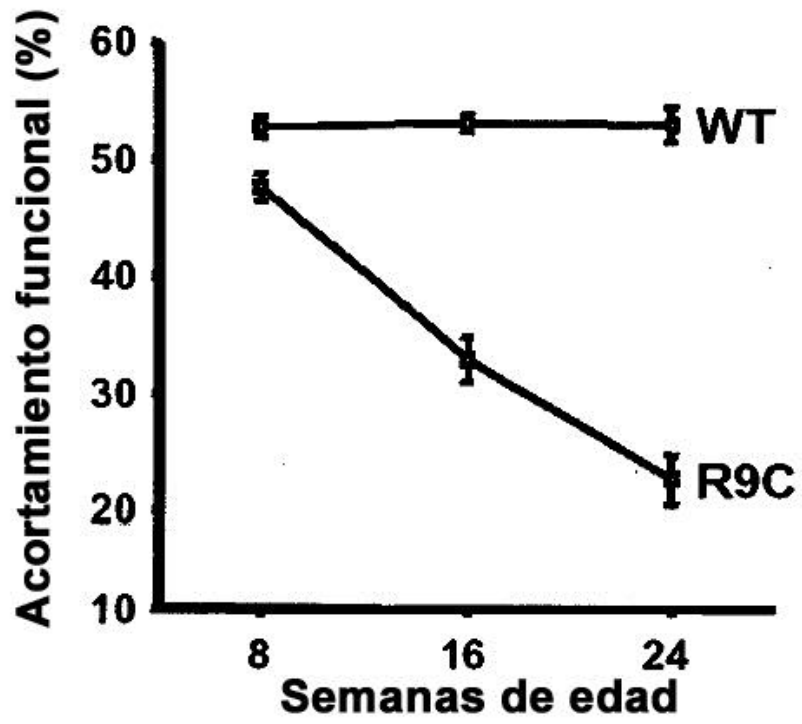
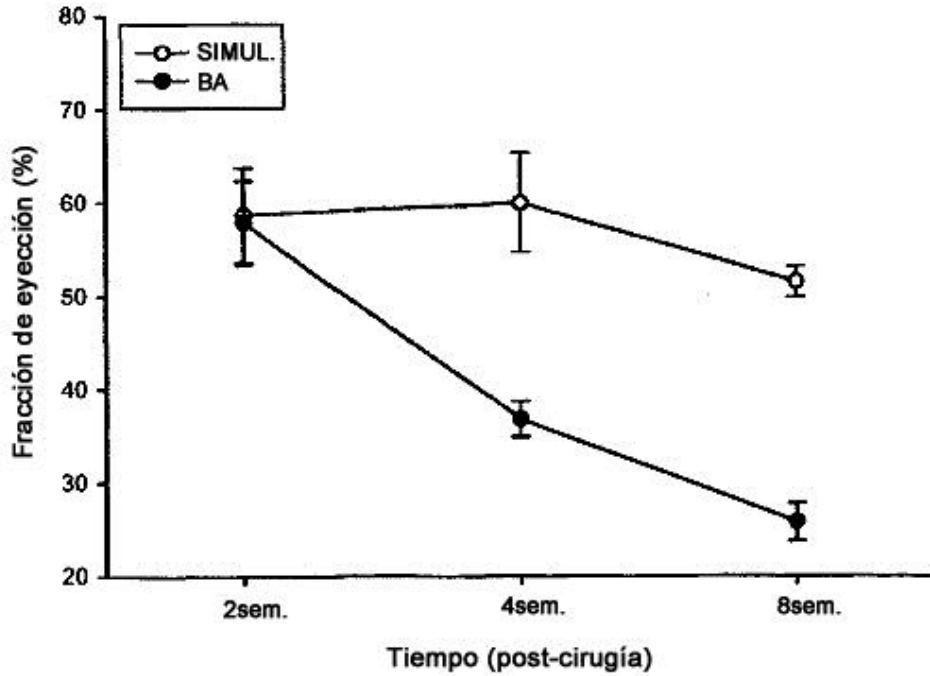
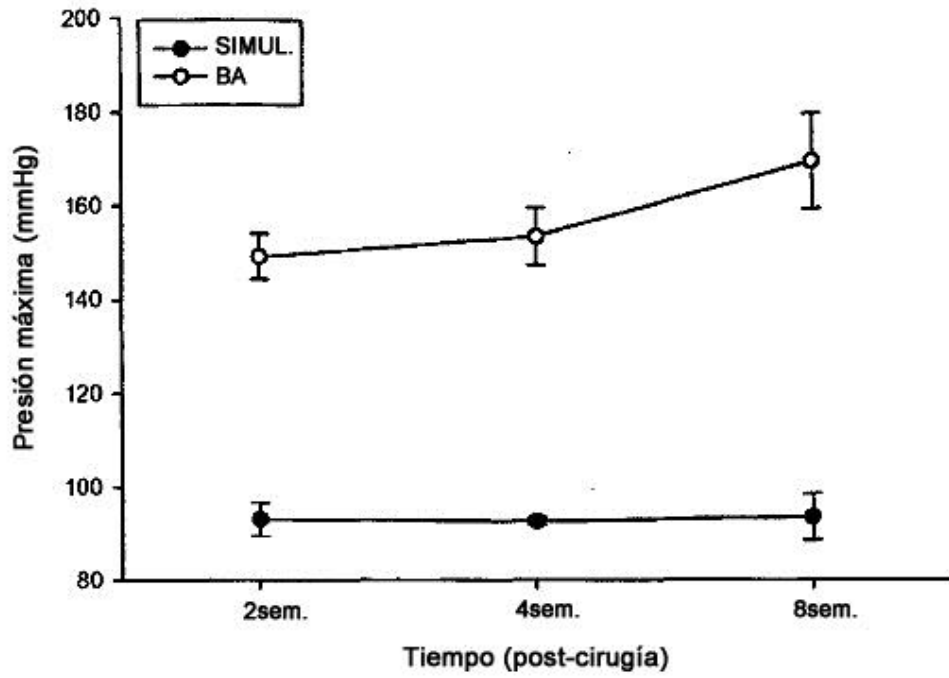


Fig. 2

Función cardiaca en ratones BA y de control



**Fig. 3**

